

발간등록번호

11-1543000-001887-01

친환경 녹색기술인 펄스전기장을 활용한 면역증강 기능의 고부가 십자화과 농산가공품 개발 및 산업화

Development of value-added immuno-stimulating food
and materials from *Brassicaceae* using PEF
eco-friendly technology

주관연구기관 / (주)비케이바이오

협동연구기관 / 중앙대학교 산학협력단

협동연구기관 / 경기대학교 산학협력단

위탁연구기관 / 어량진영농조합법인

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “친환경 녹색기술인 펄스전기장을 활용한 번역증강 기능의 고부가 첨자화
과 농산가공품 개발 및 산업화”(개발기간 : 2014. 08. 01. ~ 2017. 07. 31.)과제의 최종보
고서로 제출합니다.

2017. 11. 13.

주관연구기관명 : (주)비케이바이오

최 혁 준 (인)

협동연구기관명 : 중앙대학교 산학협력단

김 원 용 (인)

협동연구기관명 : 경기대학교 산학협력단

김 동 원 (인)

위탁연구기관명 : 어방진영농조합법인

임 동 영 (인)

주관연구책임자 : 최 혁 준

협동연구책임자 : 이 동 언

협동연구책임자 : 신 광 순

위탁연구책임자 : 임 동 영

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

보고서 요약서

| | | | | | |
|---|---|--|--------------------------------|-------------------|--|
| 과제고유번호 | 114029-03 | 해당단계 연구기간 | 14.08.01 ~ 17.07.31 | 단계구분 | 3/3 |
| 연구사업명 | 단위사업 | 농식품기술개발사업 | | | |
| | 사업명 | 고부가가치식품기술개발사업 | | | |
| 연구과제명 | 대과제명 | (해당 없음) | | | |
| | 세부과제명 | 친환경 녹색기술인 펄스전기장을 활용한 면역증강 기능의 고부가 심자화과 농산가공품 개발 및 산업화 | | | |
| 연구책임자 | 최혁준 | 해당단계 참여 연구원 수 | 총: 38 명 내부: 38 명 외부: 0 명 | 해당단계 연구개발비 | 정부: 675,000천원 민간: 225,000천원 계: 900,000천원 |
| | | 총연구기간 참여 연구원 수 | 총: 51 명 내부: 51 명 외부: 0 명 | 총연구개발비 | 정부: 675,000천원 민간: 225,000천원 계: 900,000천원 |
| 연구기관명 및 소속부서명 | (주)비케이바이오 중앙대학교 산학협력단 경기대학교 산학협력단 | | | 참여기업명 | 해당 없음 |
| 위탁연구 | 어랑진영농조합법인 | | | 연구책임자 : 임동영 | |
| <ul style="list-style-type: none"> ○ 심자화과 식물들의 품종별 면역활성 물질 연구와 품질 평가법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 심자화과 식물 중 브로콜리의 Sulforaphane 함량이 가장 우수하며, sulforaphane의 최대 증폭을 위한 최적 공정 확립함. ○ Sulforaphane 증폭을 위한 PEF 처리 조건 확립, 품종 및 제품별 비교 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 브로콜리 등 고체처리 용 연속시 PEF 처리 Chamber 개발 (Pilot scale) 하였으며, 슈퍼콜리 초미세 분말의 제조 및 식품 적용 하였음. ○ PEF처리 심자화과 식물들의 면역 및 항암 활성 비교 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 브로콜리와 적양배추 유래 다당이 면역 활성 및 중앙진이 억제활성이 우수하였으며, 브로콜리 유래 다당의 화학적 조성, 구성당 및 분자량을 통해 구조적 특성을 밝힘. ○ 펄스전기장 처리 공정의 산업화를 위한 최적화 기술 구축 및 농산품과 기능성 소재 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 면역증강 물질 sulforaphane 이 증폭된 농산품 1종 이상 개발하고 분말, 엑기스 및 푸레 소재 3종 이상 개발과 품질 규격 가이드 설정 확립함. 게다가 농산가공 소재의 산업화를 위한 포장 및 저장법 개발함. ○ 개발된 기술의 객관적 과학 근거 확보를 위한 SCI급 논문 2건, 비SCI급 논문 2건 게재, 특허등록 1건, 특허출원 2건으로 지적재산권 확보를 통한 기술적 차별화로 개발 제품의 경쟁력 확보함. | | | | 보고서 면수 384 페이지 | |

〈 요약 문 〉

| | | 코드번호 | D-01 |
|---------------------------|--|--|------|
| 연구의 목적 및 내용 | | <ul style="list-style-type: none"> ○ 연구목적 : 친환경 녹색기술인 펄스전기장 기술을 활용하여 십자화과(브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 순무, 무)의 면역증강 물질 함량을 증가시키는 기술을 개발하고, 개발된 기술을 활용하여 기능성 농산물 및 소재를 개발하고 이를 산업화하는데 있음. ○ 연구내용 <ul style="list-style-type: none"> - 십자화과 식물들의 품종별 면역활성 물질 연구와 품질 평가법 확립 - Sulforaphane 증폭을 위한 PEF 처리 조건 확립, 품종 및 제품별 비교 평가 - PEF처리 십자화과 식물들의 면역 및 항암 활성 비교 평가 - 펄스전기장 처리 공정의 산업화를 위한 최적화 기술 구축 및 농산품과 기능성 소재 개발 | |
| 연구개발성과 | | <ul style="list-style-type: none"> ○ 십자화과 식물들의 품종별 면역활성 물질 연구와 품질 평가법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 십자화과 식물 중 브로콜리의 Sulforaphane 함량이 가장 우수함 - Sulforaphane의 최대 증폭을 위한 최적 공정 확립함. - Scale Up을 통해 최적공정에 의한 처리로 sulforaphane 함량이 2배이상 증폭됨을 확인 함. - PEF 기술을 적용한 브로콜리의 기준 규격은 Sulforaphane 함량 20 mg/100g D.W, 수분함량 91% 이하, pH 6.4 이하, 당도 7.1 brix 이상으로 기준규격을 설정함. - 재배면적, 생산량, 제주도 재배비율 등을 고려하였을 때 브로콜리 성체가 가장 적합함. - 수확한 브로콜리는 0℃, 습도 95%이상의 환경에서 1~2달간 보관가능함. ○ Sulforaphane 증폭을 위한 PEF 처리 조건 확립, 품종 및 제품별 비교 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 무, 브로콜리 등 십자화과 식물에 대한 설포라판 등 기능성 대사체 분석 및 최적화 - 브로콜리 등 고체처리 용 연속시 PEF 처리 Chamber 개발 (Pilot scale) - 슈퍼콜리 초미세 분말의 제조 및 식품적용 ○ PEF처리 십자화과 식물들의 면역 및 항암 활성 비교 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 산업적 이용측면에서 브로콜리가 양배추, 적양배추 등 다른 십자화과 식물보다 수율, 저 분자획분의 세포 독성 및 다당 획분의 면역 활성이 우수함. - 브로콜리 다당에서 NK cell 활성화와 종양전이 억제활성을 확인함. - 브로콜리 유래 다당의 화학적 조성, 구성당 및 분자량을 통해 구조적 특성을 밝힘. - 적양배추 유래 다당에서 면역활성 및 항전이 효과를 나타냄. ○ 펄스전기장 처리 공정의 산업화를 위한 최적화 기술 구축 및 농산품과 기능성 소재 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 면역증강 물질 sulforaphane 이 증폭된 농산품 1종 이상 개발 (슈퍼콜리) - Sulforaphane이 증폭된 농산물을 활용한 분말 및 엑기스 소재 3종 이상 개발 - 분말, 엑기스 및 푸레 제품의 품질 규격 가이드 설정 확립함. - 농산가공 소재의 산업화를 위한 포장 및 저장법 개발함. ○ 개발된 기술의 객관적 과학 근거 확보를 위한 SCI급 논문 2건, 비SCI급 논문 2건 게재, 특허등록 1건, 특허출원 2건으로 지적재산권 확보를 통한 기술적 차별화로 개발 제품의 경쟁력 확보함. | |
| 연구개발성과의 활용계획 (기대효과) | | <ul style="list-style-type: none"> ○ 국내산 십자화과 농산품에 펄스전기장 기술(PEF) 기술 도입을 통하여 기술적으로 차별화된 고부가 농산품의 개발이 가능 <ul style="list-style-type: none"> - PEF 기술 적용 면역활성 물질 증폭 십자화과 제조에 대한 세계 최초의 차별화 기술 확보 - 열에 민감한 sulforaphane의 보전율을 높여 십자화과 농산품의 기능적 고부가 가치화 ○ 개발된 PEF 기술의 응용을 통한 다양한 농산물 적용 기술 개발 확대 및 품목 | |

| | | | | | |
|------------------------|---|--------------|-------------|-------------|---------------|
| | <p>다양화 가능</p> <ul style="list-style-type: none"> - 특히 원물, 절단품, 냉장, 냉동 제품 등 단순 가공품부터 신선 샐러드, 제과 제빵용 원료, 분말, 엑기스 등 다양한 제품으로 개발 및 적용 확대가 가능함. <p>○ 면역증강 기능을 가지는 농산품 및 기능성 소재 개발로 농산품의 기능성 재고 및 부가가치 상승 가능</p> <ul style="list-style-type: none"> - 십자화과 농산품의 기능성 증명 및 부각을 통해 농산품 이미지 재고 및 가치 상승 기대되며, 면역강화 작용, 항암작용, 알러지 억제 작용, 항산화 작용의 십자화과 식물에 대한 인식 재고 기대 | | | | |
| <p>중심어 (5개 이내)</p> | <p>친환경 녹색기술</p> | <p>펄스전기장</p> | <p>십자화과</p> | <p>설포라판</p> | <p>면역증강소재</p> |

< SUMMARY >

| | | 코드번호 | D-02 |
|----------------------|--|------|------|
| Purpose& Contents | <ul style="list-style-type: none"> ○ Purpose of study: to study improving on immuno-stimulating materials content of <i>Brassicaceae</i> (broccoli, cabbage, red cabbage, cauliflower, turnip, and white radish) using pulsed electric fields (PEF) treatment, is eco-friendly processing and develop functional agricultural products and advanced functional materials based on the PEF treatment for industrialization. ○ Content of Study: <ul style="list-style-type: none"> - To study and establish a quality assessment of immuno-stimulating materials in family Brassicaceae. - To determine PEF treatment condition for improving sulforaphane content and assess plant race & product-specific. - To investigate immunity and anti-cancer activity after PEF treatment on family Brassicaceae. - To establish an optimum technology and develop an agricultural products and functional materials for industrialization of PEF treatment processing. | | |
| Results | <ul style="list-style-type: none"> ○ To study and establish a quality assessment of immuno-stimulating materials in family <i>Brassicaceae</i> <ul style="list-style-type: none"> - Broccoli has best sulforaphane content in family Brassicaceae. - The optimum treatment processing was determined to improve sulforaphane content. - Sulforaphane content was increased over twice at scale up-PEF process. - Food standard of broccoli using PEF treatment was established (Sulforaphane content: 20 mg/100g D.W, moisture content: below 91%, pH: below 6.4, and sugar content: over 7.1 brix). - Older broccoli is most suitable when considering cultivation area, produce amount, and farming ratio. - Cultivated broccoli could be stored at 0°C and over 95% humidity for 1 or 2 months. ○ To determine PEF treatment condition for improving sulforaphane content and assess plant race & product-specific. <ul style="list-style-type: none"> - Analysis and optimization of functional metabolomic of sulforaphane on family <i>Brassicaceae</i> like white radish and broccoli. - Development of pilot scale-continuous PEF treatment chamber for solid food like broccoli. - Production of superccoli-extra fine powder and application of the power on food. ○ To investigate immunity and anti-cancer activity after PEF treatment on family <i>Brassicaceae</i>. <ul style="list-style-type: none"> - Broccoli has great immunological activity compounds, cytotoxicity of low molecular weight fraction and polysaccharide fraction in the industrial perspective compared to different family Brassicaceae like cabbage and red cabbage. | | |

| | | | | | |
|--------------------------|---|-----------------------|---------------------|--------------|------------------------------|
| | <ul style="list-style-type: none"> - NK cell activation and anti-metastasis effect was determined in polysaccharide of broccoli. - Structure characteristics were substantiated through chemical composition, constituent sugars, and molecular weight of polysaccharide from broccoli. - Polysaccharide from red cabbage has effects of immunological activity and anti-metastasis. <p>○ To establish an optimum technology and develop an agricultural products and functional materials for industrialization of PEF treatment processing.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Development of over one agricultural food product enhanced sulforaphane, is immuno-stimulating material (superccoli). - Production of powder and over 3 different extract materials using agricultural products improved sulforaphane. - Quality standard guide of powder and extract product was ensured. - Packaging and storage system of agricultural product processing for industrialization was investigated. <p>○ Scientific background of competitive advantage with developed product was reserved (Science citation index (SCI)- research paper: 2, non-SCI-research paper:2, patent incentive award: 1, patent application: 2) for objective evidence and caring intellectual property right.</p> | | | | |
| Expected Contribution | <p>○ evelopment of high-value differentiated agricultural product using PEF treatment on family Brassicaceae originated from South Korea.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Producing differentiated technology, improved immunological activities material on family Brassicaceae after PEF treatment was established in the world's first. - According to retention rate of sulforaphane, is high sensitivity temperature, agricultural products of family Brassicaceae has high functional value. <p>○ Possibility of item variety and expanding application technology using developed PEF treatment.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ability of expanding and developing various products from basic-processed foods like the originals, cut product, and cold & frozen products to fresh salads, baking materials, powder, and extract. <p>○ To increase value added and reconsider as developing agricultural product and functional material has immuno-stimulating.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Reconsideration of an agricultural product image and increase value about demonstrated functional ability and immuno-potential, anti-cancer, anti-allergy, and antioxidant in family <i>Brassicaceae</i> will be expected. | | | | |
| Keywords | Eco-friendly processing | Pulsed electric field | <i>Brassicaceae</i> | Sulforaphane | Immuno-stimulating materials |

< CONTENTS >

| | |
|--|-----|
| Chapter 1. Summary of the research and development project | 9 |
| Chapter 2. Situation of the technology in domestic and foreign | 16 |
| Chapter 3. Contents and results of the research and development | 25 |
| Part 1. Industrialization through characterization of varieties, establishment of evaluation method and optimum production process of Brassicaceae | 25 |
| Part 2. Research on varieties of Brassicaceae plants by adult and sprout type and the establishment of raw material supply system | 118 |
| Part 3. Establishment of pulsed electric fields treatment condition and comparative evaluation of varieties & products for amplification of sulforaphane | 134 |
| Part 4. Comparative evaluation of immune-stimulating and anti-cancer activity of Brassicaceae plants treated by pulsed electric fields | 215 |
| Chapter 4. The attainment of the goal and contribution for related field ... | 331 |
| Chapter 5. The application plan of the research results | 335 |
| Chapter 6. Foreign technology information obtained during the project ... | 342 |
| Chapter 7. Security level for results of research | 354 |
| Chapter 8. Current condition research facility and equipment registered in NTIS | 355 |
| Chapter 9. Results of safety actin of laboratory | 356 |
| Chapter 10. Major research capability of research and development | 363 |
| Chapter 11. The others | 367 |
| Chapter 12. References | 368 |

< 별첨 > 자체평가의견서

〈 목 차 〉

| | |
|--|-----|
| 제 1 장 연구개발과제의개요 | 9 |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황 | 16 |
| 제 3 장 연구수행 내용 및 결과 | 25 |
| 제 1 절 십자화과 품종별 특성 파악 및 평가법 확립과 최적 공정 개발을 통한 산업화 | 25 |
| 제 2 절 십자화과 식물들의 성체 및 싹의 종류별 품종 연구와 원료 수급 체계 확립 | 118 |
| 제 3 절 설폰라판(Sulforaphane) 증폭을 위한 펄스에너지(PEF) 처리 조건 확립, 품종 및 제품별 비교 평가 | 134 |
| 제 4 절 PEF 처리 십자화과 식물들의 면역 및 항암활성 비교 평가 | 215 |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 331 |
| 제 5 장 연구결과의 활용계획 등 | 335 |
| 제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 | 342 |
| 제 7 장 연구개발성과의 보안등급 | 354 |
| 제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 | 355 |
| 제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 | 356 |
| 제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적 | 363 |
| 제 11 장 기타사항 | 367 |
| 제 12 장 참고문헌 | 368 |

<별첨> 자체평가의견서

제 1 장 연구개발과제의 개요

코드번호

D-03

1. 연구개발 목적

- 친환경 녹색기술인 펄스전기장 기술을 활용하여 십자화과(브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 순무, 무)의 면역증강 물질 함량을 증가시키는 기술을 개발하고, 개발된 기술을 활용하여 기능성 농산물 및 소재를 개발하고 이를 산업화하는데 있음.

2. 연구개발의 필요성

가. 비가열(non-thermal) 식품 가공 기술

- 경제적 수준이 향상되고 건강에 대한 관심이 높아지고 소비자들의 건강한 식생활에 대한 기대가 커지면서 보다 좋은 품질, 신선한 제품에 대한 소비자의 요구가 높아지고 있음.
- 특히 과일, 야채류뿐만 아니라 가공식품에 있어서도 가능한 한 원물 그대로의 품질을 즐기고 싶어 하는 요구가 지속적으로 증가하고 있음.
- 그러나 식품을 생산하는 대부분의 공정은 열처리를 이용하기 때문에 열처리에 의해 발생하는 영양성분의 파괴, 향미의 손실, 색택의 변화, 조직감의 변화 등에 의한 기호도의 감소를 피할 수 없음. 이러한 문제로 인해 식품업계에서는 가열공정을 대체할 수 있는 가공공정의 개발을 요구하고 있음.
- 이러한 소비자 및 식품업계의 요구에 따라 최근 들어 열처리 공정을 대체하면서 고품질의 제품을 생산할 수 있는 비가열공정(non-thermal processing)에 대한 관심이 크게 증가하고 있으며 활발한 연구가 진행되고 있음.
- 지금까지 연구되고 있는 비가열공정 중 물리적인 방법으로는 고전압 펄스 전기장(high voltage pulsed electric fields, PEF), 초고압(high hydrostatic pressure, HHP), 광펄스(intense pulse light, IPL), 초음파(ultrasonification), 비가열 플라즈마(non-thermal plasma, NTP), 고전압 아크 방전(high voltage arc discharge), 이온화 조사(ionizing radiation), 진동자기장(oscillating magnetic fields) 등이 있음.
- 이와 같은 여러 가지 비열 가공기술 중 펄스 전기장, 광펄스 기술, 비가열 플라즈마, 고전압 아크 방전, 전자빔 조사, X-ray 등은 고전압의 전기 에너지를 활용하여 식품을 살균 또는 가공하는 기술이라는 공통점을 지니고 있음.
- 이중 고전압을 활용한 가공 방법들은 식품을 처리할 경우 온도가 거의 상승하지 않으며,

처리시간이 짧고 대부분 연속처리가 가능하며, 처리 후에도 식품의 물리적, 화학적 및 영양학적 특성들을 거의 변화시키지 않음.

- 이중 고전압을 활용한 가공 방법들은 식품을 처리할 경우 온도가 거의 상승하지 않으며, 처리시간이 짧고 대부분 연속처리가 가능하며, 처리 후에도 식품의 물리적, 화학적 및 영양학적 특성들을 거의 변화시키지 않음.
- 또한 이러한 전기적 비가열 가공기술은 친환경적인 기술로서 이산화탄소의 발생을 줄이고, 에너지 측면에서도 열처리 공정에 비하여 적은 에너지를 소모하는 녹색기술로서 관심을 받고 있는 기술임.

나. 펄스 전기장(pulsed electric fields, PEF) 기술

(1) 펄스 전기장 시스템의 구성과 원리

- 펄스 전기장 처리 기술의 기본 원리는 2개의 전극 사이에 대상물질을 위치시키고 전극 양단에 10 kV/cm 이상의 고전압을 가하여 순간적으로 방전시켜 전기장을 형성시킴으로써 식품을 처리하는 기술임.
- 펄스 전기장 시스템의 개략도는 <그림 1>과 같음. 펄스 전기장 시스템을 구성하는 기본적인 요소는 직류 전원장치(DC power supply), 에너지를 일시적으로 저장하기 위한 축전기(capacitor), 저장된 에너지를 순간적으로 방전시키기 위한 스위치(discharging switch), 대상물질을 처리하기 위한 처리 용기(treatment chamber with electrodes) 등임.
- 고전압 펄스 전기장의 처리는 직류전원장치에서 발생된 고전압의 에너지를 축전기에 충전시킨 후 전기적 신호에 따라 스위치가 접촉되면 축전기에 축적된 에너지가 전극을 통해 처리 용기 내에 있는 대상물질에 방류됨으로써 이루어짐.
- 대부분의 식품은 많은 양의 수분을 함유하고 있기 때문에 식품에 고전압의 전기가 인가되면 짧은 시간 (수 μsec) 내에 고전압의 전류가 흐르게 됨. 고전압의 방전에 끝나면 스위치는 다시 떨어지고 고전압의 에너지는 다시 축전기에 충전되며 이와 같은 과정을 반복하게 됨. 충전과 방전 cycle은 매우 짧은 시간, 즉 ms에서 μs 사이에서 발생하게 되며, 충전의 시간보다는 방전의 시간이 매우 작음. 따라서 식품에 수 십번의 고전압이 방전되더라도 실제 방전되는 시간 1 s 이하로 매우 짧기 때문에 열의 발생이 거의 없음.

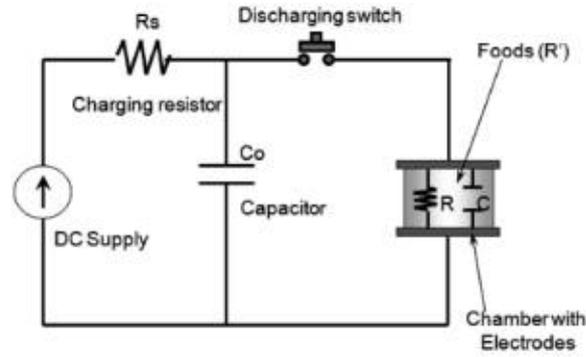


Fig 1. Schematic diagram of high voltage pulsed electric field system.

(2) 세포막 불활성화 기작

- 생물에 대한 고전압 펄스 전기장의 적용은 생물 세포막에 압력과 불안전성을 가져오게 되고 경우에 따라서는 세포막에 비가역적인 손상을 일으키고, 이온 수송의 변화, 효소의 구조 변화 등을 일으킴.
- 생물의 세포막은 펄스폭이 1 μ s 정도의 매우 짧은 고전압 전기장에 놓이게 되면 세포막이 물리적으로 파괴됨. 펄스폭이 1 μ s 정도로 짧으면 물 중에서 이온의 이동 속도는 전자에 비하여 느리므로 물 중의 각종 이온이 전극 사이를 이동할 수 없어 지금까지 알고 있던 전기분해나 전기영동과 같은 직류 전압 작용과 전혀 다른 현상이 생김. 즉 액체 내 식품은 순간적으로 높은 전기장에 노출되어 세포막이 파괴됨.
- 고전압 펄스 전기장에 의한 생물의 세포막의 붕괴 메커니즘에 대해서는 여러 가지 이론이 제안되어 있으나 세포 내외의 전위차(transmembrane potential)와 세포막의 압축 이론으로 설명할 수 있음. 세포가 강력한 전기장에 놓이게 되면 인지질 이중층으로 구성된 세포막은 이온의 이동에 의하여 극성을 띠게 됨.
- 지방 이중층(lipid bilayer)은 불량 전기도체이므로 <그림 2>에 나타낸 것과 같이 세포막 내외의 표면에는 이온이 축적되고 그 결과 transmembrane potential도 증가하며, 이 값이 임계값 1 V 이상이 되면 세포막 내외의 표면에 축적된 반대 전하의 인력에 의하여 세포막은 압축되며, 탄성한계 이상으로 압축되면 세포막은 파괴되거나 구멍이 생겨 파괴됨.

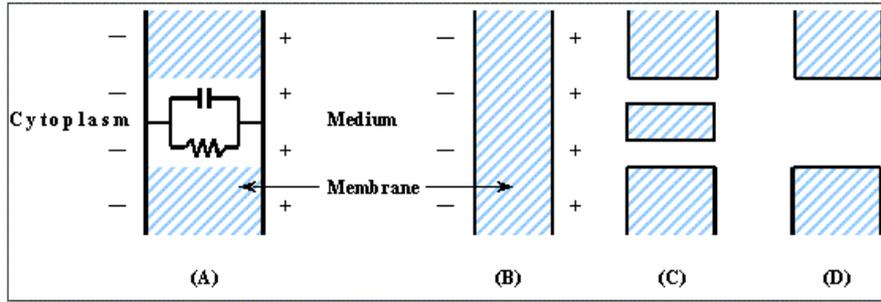


Fig 2. Electroporation of cell membrane due to compression when exposed to high intensity electric fields.

(A) in the absence of electric field $E=0$

(B) in the presence of electric field $E < E_c$

(C) in the presence of electric field $E > E_c$

(D) in the presence of electric field $E \gg E_c$

E_c represents the critical electric field.

다. 십지화과 농산물 가공에 있어 PEF의 중요성 및 의미

- 국제적으로 식품 안전성 보장, 첨가물 사용 기피, 편리성 추구에 대한 소비자의 관심사가 증가되고 있고, 식품 가공에 있어서도 최소한의 가공을 통한 식품 본연의 영양성을 보존하는 기술의 개발이 활발히 이루어지고 있으며, 인체에 유익한 생리 활성이 증가된 가공품으로도 개발이 빠르게 추진되고 있음.
- 이를 위한 가공 기술들은 열을 사용하지 않고, 압력, 전기장, 특정 파장이나 플라즈마, 냉매 등을 이용하는 기술들이며, 이들은 친환경/에너지 절감 기술에 해당됨.
- 관련 기술 개발들은 유럽, 미국 등 해외에서는 산업화가 완료되어 과일 주스의 착즙효율 증대, 기능성 약용식품으로부터의 유효 성분의 추출 효율 증대, 감자, 고구마 등 농산물의 탈수율 증대, 건조 효율 증대, 전단능 향상 등의 2차 가공적성 향상을 통한 제품 가치 상승, 위해물질 저감화를 통한 식품 안전성 증대, 영양성분의 증폭을 통한 영양가치 상승 및 제조공정 비용 감소, 육가공 제품의 육질 개선 등의 다양한 용도로 개발 및 산업화 되고 있음.
- 그러나 국내의 경우 연속 처리 기술 및 설비가 없어, 산업화에 필요한 기술 및 관련 설비를 전량 수입에 의존하고 있음.
- 따라서, 다양한 농산물 가공에 접합하도록 하는 맞춤형 펄스전기장 처리 가공 기술 개발의 선진국 기술 수준으로 향상이 필요함.
- 이를 통해 농산물 2차 가공 시 냉동, 가열 등 고에너지를 필요로 하는 공정이 대체가 가능하여 생산 투입 에너지 및 탄소발생량을 20% 이상 절감이 가능하고, 급속동결, 동결

건조, 열풍건조, 프라이닝 등의 농산물 가공 기술들과의 융합을 통해 생산된 가공품은 고품질의 제품으로서 고부가가치 창출이 가능함.

- 신선한 십자화과 식물에는 설포라판의 전구체인 글루코시놀레이트의 함량이 높고 설포라판의 함량은 상대적으로 매우 낮다. 그러나 신선한 십자화과 식물을 분쇄하여 세포벽이 파괴되면 미로시나아제에 의해 글루코시놀레이트가 설포라판으로 생물전환됨으로써 그 분쇄물에는 설포라판의 함량이 다량 존재하게 됨. 따라서 분쇄한 후 추출한 추출물에도 설포라판 함량이 신선한 농산물에 비해 현저히 증가되어, 항산화 효소의 발현 유도나 산화적 손상에 의한 유전자 변형을 억제하며, 위암의 발병의 한 원인으로 알려져 있는 헬리코박터 파이로리균의 성장을 억제하고, 동물실험에서 발암물질에 의한 위암의 생성을 저해하는 것으로 알려져 있음.
- 십자화과 농산물은 일부 가공식품의 원재료로서 사용되기도 하지만 대부분 샐러드의 형태로 섭취되는 채소로서, 이를 이용하여 샐러드를 제조할 경우 십자화과 농산물의 씹는 질감을 부드럽게 하기 위하여 수증기 또는 끓는 물에 데치는 것이 일반적임. 그러나 신선한 농산물에 열이 가해질 경우 글루코시놀레이트가 분해되어 함량이 현저히 감소되고, 설포라판 형성 효소인 미로시나아제도 쉽게 불활성화 되어, 최종적으로 설포라판 함량도 감소하게 되는 문제가 있음.

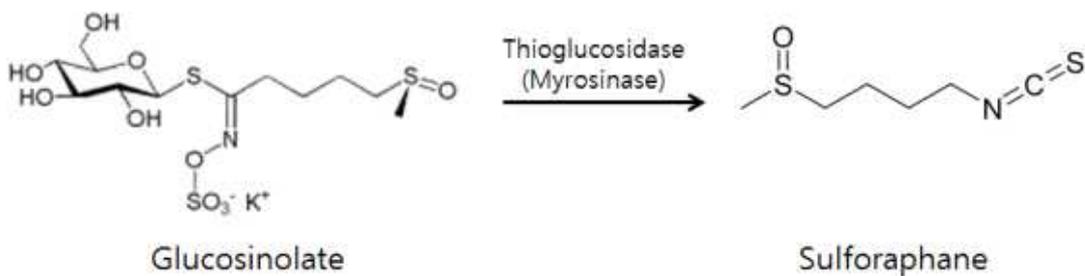


Fig 3. 설포라판의 합성 기작

- 펄스 전기장 처리는 변패 작용을 하는 미생물의 비열 살균 방법의 하나로서 풍미에 영향을 덜 주면서도 저장성을 늘릴 수 있는 방법으로 알려져 있으며(한국공개특허 특 2000-0016830호), 추출 수율을 증진시키기 위한 전처리 방법의 하나로서 알려져 있으나(한국공개특허 제10-2010-0052065호), 이를 십자화과 식물의 가공에 이용하여 글루코시놀레이트와 미로시나아제의 반응을 유도하여 설포라판을 증대시키는 효과에 대해서는 보고된 바가 없음.
- 따라서, 십자화과 농산물의 경우 항암성분인 설포라판(sulforaphane)의 전구체와 이를 합성하는 효소가 다량 존재하지만, 조리과정 중에 열에 의해 대부분 파괴가 되므로, 기능성분들의 섭취가 원활히 되고 있지 않기에, 펄스 전기장 기술은 비열 처리 가공 기술로

서 효과적으로 세포벽의 가역적인 파괴를 유도함으로써 sulforaphane의 생합성을 효과적으로 증폭하고 열처리 공정이 필요 없게 함으로서, 가열에 의한 sulforaphane의 손실을 최소화 할 수 있는 기술로 의미가 큼.

- 본 연구에서는 대표적 십자화과 농산물이 보유하는 sulforaphane의 면역활성 특성 및 작용 기작으로 해명함으로써 면역활성과 구조의 상관관계를 해명하는 것을 포함하며, 생체 조절 물질을 소재화함에 있어 오랫동안 식품소재로 이용되어 온 십자화과 식물들을 대상으로 하는 것은 최종물질의 안전성 확보가 용이하므로 의약품 및 기능성식품 소재로 실용화될 확률이 높다고 판단됨. 이들 십자화과 식물들은 앞서 언급한 생리활성 물질을 다량 함유하고 있어 새로운 형태의 건강 및 기능성 식품 등 다양한 산업적 용도로의 개발도 가능할 것으로 사료됨.
- 매년 대량 생산되는 제주산을 비롯한 국내산 십자화과 식물로부터 PEF를 이용하여 면역 증강 기능의 농산품 개발 및 소재화 하여 산업화하는 것으로서, sulforaphane 등의 지표물질의 검증/선정하고 in vitro, in vivo test를 통한 효능 기전을 규명하여 국내산 십자화과 농산품의 가치를 상승시키며, 더 나아가 추출, 농축 등의 가공을 통해 개별인정형 건강기능식품으로 원료화 할 수 있음.
- 또한 개발 소재의 경제적 산업화를 위한 대량 생산공정을 확립하고, 이를 포함하는 면역활성 기능의 농산품 및 기능성 소재와 식품을 개발하여 국내 시장 확대 및 해외 기능성 시장 진출을 목표로 추진하려는 것임.
- 결론적으로 상기 연구 필요성을 요약하면 국내외 면역 결핍 관련 질병 치료비용에 대한 국가적 부담이 증대되고 있어 예방 및 치료 제품에 대한 시장이 앞으로 계속 증가될 예정이고, 또한 신종 전염병 발생에 따른 면역증강 식품에 대한 수요도 매년 증가하고 있는 추세이므로, 천연유래의 기능성 제품 연구 및 개발과 판매가 앞서 있는 유럽과 미국 시장에 대응할 수 있는 국내 농산물의 품질 차별화를 통한 고부가가치화 및 이를 활용한 기능성 소재 개발이 시급하다 할 수 있음.

3. 연구개발 범위

- 십자화과 식물들의 품종별 면역활성 물질 연구와 품질 평가법 확립
 - 십자화과 식물인 브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 순무, 무의 성체 및 싹 종류별 품종 연구 및 원료 수급 체계 확립
 - 면역증강 성분 Sulforaphane와 전구체 glucosinolate의 HPLC, LC-MS법을 통한 분석법 표준화
 - 표준화 분석법을 통한 원료별 물리, 화학적 품질 및 특성 평가
- Sulforaphane 증폭을 위한 PEF 처리 조건 확립, 품종 및 제품별 비교 평가

- 면역증강 성분 전환 효소인 myrosinase(thioglucoside glucohydrolase)의 활성 측정법 표준화
 - Batch PEF chamber를 이용한 myrosinase kinetics 및 변수 연구
 - Batch PEF chamber를 이용한 원료별 PEF 최적 처리 조건의 확립 및 우수 원료 제시
 - 우수 원료를 대상으로 한 PEF chamber 공정 컨셉 디자인 개발과 PEF 조건 최적화를 통한 에너지 절약형 공정 가이드 제시
- PEF처리 십자화와 식물들의 면역 및 항암 활성 비교 평가
- 원재료와 PEF 처리된 십자화와 식물의 면역활성 비교에 의한 고효성 식물 선별
 - PEF 처리 십자화와 식물에 의한 *in vivo* 면역 및 항암활성 평가
 - PEF 처리 십자화와 식물 유래 활성성분의 작용양식 해명
 - 가공제품으로부터 활성성분의 분리, 함량 결정 및 지표물질의 선정
 - 면역 및 항암 활성성분의 구조, 화학적 특성 규명
- 펄스전기장 처리 공정의 산업화를 위한 최적화 기술 구축 및 농산품과 기능성 소재 개발
- 산업화를 위한 최적 sulforaphane증폭과 면역증강 활성을 가지는 십자화와 식물 원료의 선정
 - 면역증강 성분인 sulforaphane의 최대 증폭을 위한 최적의 PEF처리 조건 선정
 - PEF처리 공정 연속 공정 디자인과 공정별 변수 최적화(처리시간, 수분 조절 등) 및 scale up
 - PEF처리 농산품의 물리, 화학적 품질 특성 평가 비교와 안정성 평가, 가공적성 연구, 품질관리 등 품질 기준 규격 가이드 설정
 - PEF처리 농산품을 원료로 한 분말화 연구 및 엑기스 제조를 위한 추출법 개발
 - 분말 및 엑기스 제품의 품질 규격 가이드 설정
 - 농산가공 소재의 산업화를 위한 포장 및 저장법 개발
 - Pilot test를 통한 공정 검증 및 최종 prototype의 완성과 관능, 품질, 가공적성, shelf-life 평가
 - 개발된 농산품 1종 및 소재 2종의 시제품 생산

제 2 장 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

1. 펄스 전기장에 의한 식품의 적용

- 펄스 플라즈마 장치의 핵심이라 할 수 있는 펄스 발생 장치를 이용한 비열 살균장치의 개발은 독일, 미국, 일본 등 기술 선진국에서 1990년대부터 본격적으로 연구되기 시작하였으며, 가열 조작에 의한 에너지 손실을 방지할 수 있고 식품이 변질되지 않는 특징을 가지고 있어 앞으로 실용화가 가장 기대되는 새로운 기술임.
- 펄스 전기장은 세포막을 불활성화할 수 있는 연구결과를 바탕으로 식품살균에 직접적으로 적용하는 실험들이 이루어지고 있음. 지금까지의 식품살균에의 적용을 보면 미국의 Maxwell Lab.은 과일 주스나 액란의 살균, 연세대학교에서는 당근주스, 전주대학교에서는 김치소스와 같은 식품의 살균에 대한 연구결과를 발표하였음.
- 독일의 Krupp Maschinenteknik GmbH에서는 ELSTERIL이란 펄스 전기장에 의한 살균 공정을 개발하였으며, 동 연구팀과 FML Europe N.V, Berlin 대학과 공동 연구로 연속식 살균 장치를 개발하고 신선한 오렌지 주스를 펄스 전기장으로 처리한 결과 신선한 착즙 주스의 품질을 거의 손상시키지 않으면서 오렌지 주스의 균수를 3 log 정도 감소시킬 수 있었음.
- 미국 Washington 주립대학의 Barbosa 등은 사과 주스의 초기 *Saccharomyces cerevisiae*의 농도가 106 cell/mL인 경우에 40 kV/cm에서 10 Hz로 펄스를 반복 처리함으로써 1 CFU/mL까지 감소시킬 수 있었다고 하였음. 또한 Grahl은 우유, 오렌지 주스를 펄스 전기장을 이용하여 살균한 결과 미생물에 20 kV/cm 이상의 전기장을 걸어주면 효과적으로 사멸시킬 수 있었다고 보고하였음.
- Ohio 주립대학의 Zhang 교수 연구팀에서는 시간당 2,000 L를 처리할 수 있는 pilot 규모의 연속식 PEF 처리장치와 무균 포장장치를 연결하여 오렌지 주스를 생산하는 실험을 실시한 바 있으며, 우유 살균의 경우 3단계의 펄스 전기장 처리가 필요하였으며, 각 단계에서 16 pulse 처리를 하여 2-3 log 정도의 균수를 감소시켰음.
- 또한 독일 Berlin 대학의 Knorr 교수 그룹의 미발표된 자료에 의하면 초고온 살균한 우유에 *Pseudomonas fluorescences*를 현탁시키고 7-22.5 kV/cm 범위의 펄스 전기장으로 20 pulse 처리하였을 때 전계 강도를 증가시킴에 따라 최대 4 log까지 균수를 감소시킬 수 있었다고 보고하였음.
- 일본 君馬大學의 佐々木(1976)교수는 맥주 효모를 106 cell/mL 정도로 맥아즙과 맥주에 현탁시키고 펄스 전기장 처리를 한 결과 13 kV/cm 이상에서 효모가 사멸되기 시작하여 전계강도가 증가함에 따라 비례적으로 감소한다고 하였음. 또한 *Lactobacillus brevis*를 맥

주에 2×10^2 cell/mL 현탁시키고 전계 강도 20 kV/cm, 체류시간 11 min, 450 pulse/min를 걸어 주었을 때 완전히 사멸되었으며, 이 경우 맥주의 품질은 일반적인 성분 분석값 및 시음 테스트 결과 처리 전후에 변화가 없다고 기술하였음.

- 산업적으로는 독일, 네덜란드, 영국 등 유럽 및 미국을 중심으로 산업화에 적용이 되어 신선 주스, 스무디 등의 음료에 적용이 활발히 진행되고 있으며, 최근 감자, 고구마, 당근 등의 서류 및 야채류 농산물의 전처리 공정에 적용되고 있음. 대표적인 산업화 사례는 Hoogesteger(NL), FruityKing(NL), Wernsing GmbH(German), Cosun(NL), Orchard House(UK), Lassonde(Canada), Uelzena(Germany), Simplot(USA) 사임.
- 특히 감자의 경우 2013년도 미국 냉동감자 생산 수출량은 92만 6,553톤으로 용적으로 2% 증가되었고, 10억 4,872만 8,731달러로 가치는 6% 증가함. 이는 냉동감자 생산 수출 역대 최고의 기록으로 10억 달러 이상의 기록을 세운 것임. 수출량은 양적으로 4% 증가되었고, 멕시코 28% 증가, 대한민국 8% 증가, 말레이시아 8% 증가, 베트남 15% 증가에 인한 것이며, 이러한 시장 확대에 펄스 전기장 기술이 도입되어 시장 확대에 많은 영향을 끼치고 있다고 판단됨.
- 상기와 같이 유럽과 미국을 중심으로 농산물 처리, 음료의 살균 기술에 대한 연구가 활발하고, 산업화가 완료되어 기술이 적용된 제품들이 출시되고 있고, PEF 처리를 한 대부분의 식품은 기존의 열처리 공정을 거친 식품과 품질 비교를 하였을 경우 거의 차이가 없거나 우수한 것으로 평가되고 있음.
- 관련 기술들의 개발 및 산업화는 유럽 및 미국에서 활발히 수행되고 있으나, 국내의 경우 가공 설비 및 산업화 처리 기술이 전무하여 전 분야에 걸쳐 설비 및 관련 기술을 도입 또는 라이선싱 하고 있는 실정임.
- 해외의 대표적인 적용 농산물인 감자의 경우 국내 시장은 2013년 1,800억원 수준으로 연간 5~8% 수준으로 성장세에 있으며, 십자화과 식물 중 대표적인 브로콜리의 경우 650억 규모의 시장을 형성하고 있음.
- 또한 국내산 농산물을 이용한 편의/간편식/식사대용식 제품(스낵류, 제과 제빵 원료 등) 시장도 2013년부터 관련 신제품들이 출시되면서 활발한 도입기에 접어들고 있음. 당근, 브로콜리 등을 이용한 유아용, 노인용 간편식이 시장이 활발히 출시되고 있으며, 마늘분말 등 편의성이 증대된 최소 가공 농산가공품(동결건조제품류) 시장이 확대되고 있음.
- 펄스전기장 가공 기술은 국내의 경우 아직 산업화 적용에 대한 연구가 미진한 실정이며, 일부 대학에서 실험실 규모의 단순 처리 장치를 가지고, 비연속식으로 처리하는 수준의 규모로 연구되어 왔으나, 2011년 주관기관에서 batch형 pilot설비 도입 및 산업화 적용에 대한 응용 기술 개발하여 녹색 기술로 인정받아, 기술 응용 제품 개발에 연구 투자를 축

진하고 있음.

2. 펄스 전기장 발생장치

- 미생물 살균에 가장 효과적인 것으로 알려져 있는 square wave pulse를 적용할 경우에는 transmission line의 impedance의 특성과 식품의 저항을 일치시키는 것이 문제이며, 이와 같은 문제를 해결하기 위하여 특수한 pulse forming network(PFN)를 설계 제작하여야 함.
- 펄스 전기장을 이용한 살균 장치의 개발에서 pulse generator로부터 발생하는 펄스를 식품으로 매우 빠르게 방전하는 switching 장치가 중요함.
- 1990년대 초반까지는 spark gap switch를 주로 사용하였으나, 1995년 미국 Ohio 주립대학의 Zhang 등은 thyatron switch를 사용하였으며, 미국의 Purepulse 사에서는 이 기술을 이용하여 사업화를 목표로 하여 Coolpure라는 장치를 개발하기 시작하였음.

3. 에너지 절약 효과

- 펄스 전기장에 의한 처리 공정의 에너지 효율은 연구자에 따라 다소 차이는 있으나 현저히 에너지가 절약되는 것으로 보고되고 있음.
- 미국 Washington 대학의 사과 주스 살균 공정에 대한 에너지 효율 분석 결과에 의하면 사과 주스 중의 Saccharomyces cerevisiae를 6 log 감소시키기 위하여 전계강도 35-50 kV/cm, 2-8 pulse(pulse duration 2.5 μ s)의 펄스 전기장을 걸어 주었을 때 사과 주스의 온도는 22-34 $^{\circ}$ C까지 상승하며, 이 때 에너지 소비량은 28-62 J/mL인 것으로 계산됨. 그러나 가열 살균 공정의 열효율은 40-50%이므로 실제 소요 에너지는 360-900 J/mL 범위가 될 것으로 추정됨. 이와 같은 점을 종합해 볼 때 펄스 전기장 살균은 채대 가열 살균에 비하여 1/6-1/30 정도 에너지가 절약되는 것으로 추정됨.
- 식품의 살균에 적용하기 위해 Ohio 주립대학 연구팀은 PEF 공정을 위한 식품의 조건 및 PEF system의 경제성을 분석하였음. PEF 살균기술이 적용 가능한 식품은 액체식품, 고체입자 함유 식품, 일부 고형 식품 등으로, 연속 시스템의 도입을 위해서는 pumping이 가능하고 고형분이 포함되어 있을 경우에는 고른 분산이 가능하여야 하며, 크기에 제한이 있음.
- 또한 고형식품의 경우에는 회분식 처리만이 가능하며, 두께 30 mm 이하의 균일한 크기를 갖고 충분한 수분을 가져야 함. 경제성 분석 결과에 의하면 효모를 기준으로 50 $^{\circ}$ C를 넘지 않는 범위에서 5 log의 사멸을 얻기 위해서는 100 J/mL의 에너지, 0.17 cent/L가 펄

요하며, 전기적 에너지에 의한 온도의 상승을 막기 위한 냉각 시스템에는 약 170 J/mL, 0.22 cent/L 정도가 필요한 것으로 분석됨.

4. 처리용기

- 펄스 전기장 처리를 위한 chamber는 기본적으로 식품과 접촉하는 2개의 전극과 전극 사이의 간격으로 이루어져 있으며, 식품과 접촉하는 전극 면적에 비하여 전극 사이의 간격이 아주 작아야 함.
- 처리 용기에는 기본적으로 static chamber와 continuous chamber의 두 가지 형태가 개발되고 있음. Static chamber는 실험실에서의 기초 연구에 적합하고 pilot plant 또는 상업용 장치 개발을 위해서는 continuous chamber 사용이 적절함.

5. 펄스 전기장 기술의 장점

- 펄스 전기장 기술은 10-50 kV의 고전압을 매우 짧은 시간 동안 식품에 가하여 식품의 세포벽을 선택적으로 파괴시킬 수 있는 최신 비열 처리 기술임.
- 상온의 영역에서 처리되므로 열처리에 의해 품질의 특성이 열화되는 야채, 과일의 가공 및 유제품을 비롯하여 식초음료, 막걸리 등 발효식품의 살균에 효과적으로 확대되어 사용될 수 있음.
- 펄스 전기장 기술은 고상 제품의 배치식 및 연속처 처리가 가능하고, 액상제품의 연속적 처리도 가능하며 미립자를 포함한 액상제품부터 고상의 제품에까지 널리 적용 가능함.
- 펄스 전기장 장치설비의 경우 전기발생 장치 이외에 특별히 별도의 설비기 필요치 않아 간단하게 현장 적용이 가능하며, 기기장치의 도입 비용도 저렴하고 처리비용도 1-2 €/t 수준으로 저렴하여 열에너지 절약 및 탄소 발생 저감 효과가 뛰어나며, 연속적 공정으로 사용이 가능하여 식품 가공 기술로서 다양한 적용을 시도할 수 있음.
- 현재 알려진 펄스 전기장 장치의 이용 목적은 고상 제품의 절단, 건조 탈수 용이, 내용물의 추출 효율 향상, 액상 식품의 미생물 오염 제거, 5-7 log cycle 범위의 병원균 및 부패 유기물의 불활성, 제품의 유통기한 증가, 비타민, 단백질 등 영양성분의 유지, 제품의 기능적 특성에 영향을 끼치지 않아 신선 주스, 유제품, 영양강화 음료 및 화장품 등 열에 민감한 여러 제품에 효과적으로 적용 가능한 연구 결과와 사례들이 나오고 있음.
- 따라서 PEF처리 기술은 새로운 비열 가공 기술 개발로 과도한 가열처리에 따른 영양소 손실을 방지하며, 신선하고 품질이 우수한 농산품 및 가공품의 개발에 선도적인 역할을 하여, 궁극적으로 국민 영양밸런스 개선에 이바지 할 수 있는 기술로 평가됨.

Table 1. 비가열 살균 처리 장치 비교

| ELCRACK® Model | | | 5 kW | 30 kW | 5 kW | 30 kW |
|-------------------------|-----------|--|-----------------------|-------|------------------------|-------|
| Application | | | Tissue disintegration | | Microbial inactivation | |
| Average power | kW | | 5 | 30 | 5 | 30 |
| Chamber diameter | mm | | 25 | 25 | 10 | 10 |
| Electric field strength | kV/cm | | 10 | 12 | 30 | 30 |
| Specific energy | kJ/kg | | 5 | 5 | 50 | 50 |
| Operation | | | | | | |
| per day | h | | 20 | 20 | 20 | 20 |
| per year | h | | 4400 | 4400 | 4400 | 4400 |
| Capacity | | | | | | |
| Production | kg/h | | 3600 | 21600 | 360 | 2160 |
| Daily production | t | | 72.0 | 432.0 | 7.2 | 43.2 |
| Operating costs per kg | | | | | | |
| Depreciation | € cent/kg | | 0.078 | 0.033 | 0.821 | 0.337 |
| Maintenance/wear | € cent/kg | | 0.002 | 0.001 | 0.205 | 0.084 |
| Energy | € cent/kg | | 0.021 | 0.021 | 0.208 | 0.208 |
| Total | € cent/kg | | 0.101 | 0.054 | 1.234 | 0.629 |
| Total per t | €/t | | 1.011 | 0.543 | 12.342 | 6.292 |
| Energy costs | | | | | | |
| | €/kWh | | 0.120 | | | |

6. 십자화과 식물과 설폰라판의 면역증강 기능

- 십자화과(Cruciferae/Brassicaceae)는 브로콜리, 적양배추, 순무, 양배추, 콜리플라워, 무잎, 배추, 케일 등이 속하며, 속씨식물 십자화목의 과 가운데 하나이다. 네 개의 꽃잎이 십자 형태를 보여주며 배추와 겨자 등의 식용 작물이 이 분류에 속한다. 200속 1800여 종이 주로 한대·온대 지방과 고산지대에 있는데, 우리나라에 17속 37종이 자생한다고 알려져 있음.
- 이들 십자화과는 오래기간 동안 식탁에서 빠지지 않은 음식 재료들로 비타민 A, B, K, E 등의 풍부하며 무기질은 칼슘, 마그네슘, 철, 망간, 아연, 칼륨 등이 풍부하여 발암물질의 활성 억제 및 함암 효과가 알려져 있음.
- 특히 케일의 경우 클로로필의 경우 시금치 보다 1.47배, 칼슘은 우유의 3배, 비타민C는 귤보다 3배 이상 많이 함유되어 있어, 항돌연변이 효과 및 암세포 사멸 효과, 암세포의 DNA합성 억제, 발암 억제 기능이 알려져 있음.
- 브로콜리의 경우 설폰라판은 높은 항암활성으로 유명한데, 최근 유방암 암세포의 증식 억제 효과의 연구결과가 나왔으며, 각종 면역 활성이 효과가 우수한 것으로 확인되고 있음.
- 설폰라판(Sulforaphane)은 십자화과 채소에 존재하는 항암, 항산화 물질로서, 십자화과 채소에 존재하는 2차 대사산물인 글루코시놀레이트(glucosinolate)가 효소에 의해 가수분해됨으로써 얻어지는 이소티오시아네이트(isothiocyanate)의 일종임.

- 강력한 항산화 효과를 갖는 것으로 알려진 글루코시놀레이트가 소화 과정 중 장내세균에 의해 분비되는 미로시나아제(myrosinase)에 의해 가수분해되어 이소시아네이트(ITC), 인돌-3-카비놀(I3C), 알릴시아네이트(allycyanate), 설포라판 등을 생성함.



Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

Journal of Nutritional Biochemistry 23 (2012) 1617–1626

**Journal of
Nutritional
Biochemistry**

Sulforaphane inhibits pancreatic cancer through disrupting Hsp90–p50^{Cdc37} complex and direct interactions with amino acids residues of Hsp90[☆]

Yanyan Li^{a,b,1}, G. Elif Karagöz^{c,1}, Young Ho Seo^a, Tao Zhang^a, Yiqun Jiang^a, Yanke Yu^a, Afonso M.S. Duarte^c, Steven J. Schwartz^b, Rolf Boelens^d, Kate Carroll^{e,*}, Stefan G.D. Rüdiger^{c,*}, Duxin Sun^{a,*}

^aDepartment of Pharmaceutical Sciences, University of Michigan, Michigan, USA

^bDepartment of Food Science and Technology, Ohio State University, Ohio, USA

^cCellular Protein Chemistry, Bijvoet Center for Biomolecular Research, Utrecht University, Netherlands

^dBiomolecular NMR Spectroscopy, Bijvoet Center for Biomolecular Research, Utrecht University, Netherlands

^eThe Scripps Research Institute, Scripps Florida, USA

Received 29 June 2011; received in revised form 9 November 2011; accepted 14 November 2011

Fig 5. 설포라판의 효능 연구 자료 예시

- 특히 양배추의 항암효과는 글루코시놀레이트의 가수분해 산물 등에 의해 기인한다고 알려져 있고, 설포라판은 지난 1992년 미국 존스 홉킨스대학의 폴 텔러리(Paul Talalay)에 의해 강력한 항산화 효과를 갖는 것으로 알려졌음. 설포라판에 의한 항산화 효소의 발현 유도는 산화적 손상에 의한 유전자 변형을 막아주며, 위암 발생의 주요한 인자로 알려져 있는 헬리코박터 파이로리균의 활성을 억제하였고, 동물실험에서 발암물질에 의해 유발된 위암의 생성을 저해하는 것으로 연구됨.
- 설포라판은 항암 및 헬리코박터 파이로리 억제 효과 이외에 염증 유발인자 활성 저해하는 것으로 알려져 있음. 'Cancer letter'에 발표된 연구결과에 따르면 마우스를 대상으로 실시한 실험에서 설포라판은 피부암 억제에 탁월한 효과를 나타내는 것으로 보고 되었음.
- 또한 싱가포르 국립대학의 연구결과에 따르면 인체의 지방암 세포를 대상으로 실시한 실험에서 지방암을 효과적으로 억제하는 것으로 보고되었는데, 특히 설포라판은 glutathione S-transferase(GST) enzyme activity의 활동을 강화하여 많은 발암성 물질을 치료하는 것으로 알려져 있음. 설포라판은 phase II detoxication enzymes로 알려져 있는 quinone reductase [NAD(P)H:(quinone-acceptor) oxidoreductase]의 활동을 강화하여 발암물질의 성장을 억제한다고 보고됨.
- 설포라판은 십자화과 채소에 많이 들어있는데, 양배추, 브로콜리, 방울다다기양배추

(Brussels sprouts), 콜리플라워, 케일, bok choy, 연두색 중국산 양배추, 아루굴라(arugula), 콜라드(collards, 케일의 변종), 콜라비(kohlrabi), 겨자, 순무(turnip), 적무(red radish), 물냉이(watercress) 등에 들어있음.

- 상기 설폴라판은 십자화과 식물들에 대량 분포되어 있는데, 최근 분석 결과에 의하면 브로콜리 14.81 ppm, 적양배추 7.92 ppm, 순무 0.62 ppm, 양배추 0.42 ppm, 콜리플라워 0.30 ppm, 무잎 0.30 ppm, 무 0.14 ppm, 배추 nd, 케일 nd로 함유되어 있다고 보고되고 있으며, 성체보다도 싹에 10배 이상으로 함유되어 있다고 알려져 있음.
- 세계 기능성 식품 시장은 2007년 3,771억 달러(2002년 대비 86%)증가로 예상되며, 우리나라의 경우 2009년 신종플루 유행으로 건강기능식품 중 면역력 강화효과가 있는 홍삼 제품의 판매가 기하급수적으로 증가하였음. 그러나 홍삼이외에 면역 증강 효과를 가지는 건강기능식품 소재 및 제품 종류의 확대는 활발하게 진행되지 못하고 있는 실정이므로, 국내산 십자화가 식품들로 부터의 면역증강 기능의 발굴 및 응용 제품 개발은 큰 의의가 있음.
- 천연물로부터 신규 면역활성 다당체 (rhamnogalacturonan I 및 II 또는 arabinoxylan)를 선택적으로 분리하고 이들의 상세 구조를 해명함과 동시에 구조와 활성간의 관계를 규명하는 연구는 전무하며 이들을 산업적으로 응용한 예도 전무함.
- 그간 국내외에서 진행되어 왔던 연구 내용을 종합해 볼 때, 식물 유래의 다당, 특히 열수로 추출이 용이한 pectin과 pectic polysaccharide 또는 이들의 분해물(arabinogalactan 등) 및 arabinoxylan 등의 hemicellulose는 면역기능을 증진시키고 이를 통하여 항암 효과, 상처 치료 및 또 다른 치료 효과를 나타냄을 알 수 있음.
- 식물 다당이 갖는 면역활성화 작용은 펙틴 다당 분자 내의 homogalacturonan 보다는 rhamnogalacturonan I (galactan, arabinan 및 arabinogalactan 등으로 고도로 분지된 영역) 및 rhamnogalacturonan II 등 특정 구조 혹은 그들의 미세구조에 의해 결정되는 것으로 판단되고 있으며 이제까지 보고된 많은 연구에서 알 수 있듯이 식물 다당이 갖는 면역활성에 대해서는 비교적 높은 수준과 양적 결과를 제시하고 있으나, 이들의 상세구조 또는 구조와 기능의 상관관계(structure/function relationship)에 대한 연구는 상대적으로 미진하다 할 수 있음.
- 특히 대부분의 약리활성들이 소위 rhamnogalacturonan과 arabinoxylan 등으로 불리고 있는 분지영역 (ramified region, hairy region)에서 관찰되고 있다는 사실은 활성을 발현하는데 필수적으로 요구되는 구조의 정확한 서열과 분지쇄(side chains)의 미세구조에 대한 연구가 시급하다는 사실을 보여주고 있음
- 외국에서는 주로 일본의 Taiwa사를 중심으로 미강으로부터 발효기법에 의해 arabinoxylan을 분리, "BioBran" 또는 "MGN-3"라는 상품명으로 면역활성 증강제로 시판되고 있음.

❖ Rice bran (米糠)

: BioBran™ or MGN-3 by Taiwa Co. JAPAN
 : ERBP-4 by Erom Co., Korea

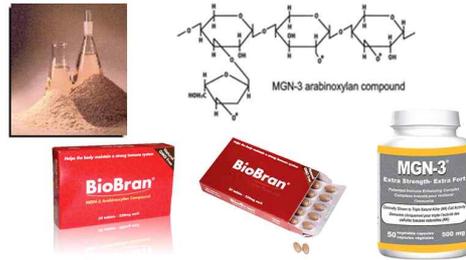


Fig 6. 미강으로부터 발효기법을 이용한 제품 예시

○ 또한 미국의 La Jolla Pharmaceutical Co.에서는 굴껍질로부터 펙틴 기원의 rhamnogalacturonana I의 측쇄인 arabinogalactan을 선택적으로 분리, GCS-100이라는 항암제 개발, 임상3상을 실시 중에 있으며, 이들은 면역활성화 작용과 암세포에서 특이적으로 다량 발현하는 galectin-3의 antagonist로 작용하여 항암 활성을 보인다고 보고되어 있음.

❖ Modified citrus pectin (RG-I)

- Source : citrus peel
- Main component : Rhamnogalacturonan I in modified citrus pectin
- M.W. : 100 - 5000 kD
- Physiological activity : *Anti-tumor activity by immunomodulation
 *Strong Galectin-3 antagonist
- Manufacture : La Jolla Pharm. Co., USA
- Structure and active moiety

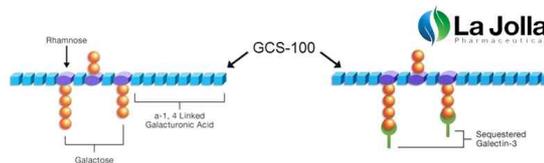


Fig 7. 감귤류의 껍질로부터 분리된 RG-I의 구조

○ 굴껍질로부터 생산한 면역 활성 다당 RG-I은 또한 "Pectrasol-C", "Modified citrus pectin", "MCP" 등의 상품명을 갖는 기능성 식품으로 활발히 시판되고 있음.

❖ Modified citrus pectin

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ● For pharmaceuticals : GCS-100™ : Phase II study (in progress) | <ul style="list-style-type: none"> ● For Nutraceuticals : PectraSol-C™ : Modified citrus pectin™ : MCP™ |
|---|---|



Fig 8. 감귤류 껍질 유래의 다당(RG-I)을 이용한 제품 예시

- 2011년 12월말을 기준으로 한국 식품의약품안전청이 개별인정형으로 허가한 기능성 원료는 총 165종(동일한 원료에서 2개 이상 기능성이 인정된 경우가 합산)으로 이중에서 ‘면역력 증진’을 기능성으로 하는 원료는 8종에 불과함. 또한 이들 중 대부분은 세균, 효모 및 버섯균 유래의 미생물 유래 다당을 기본으로 하는 원료임을 감안할 때 본 논문에서 제시한 바와 같이 식물 유래의 면역활성 다당이 새로운 건기식 소재 또는 의약품으로 개발될 수 있는 가능성은 매우 높다고 할 수 있음.
- 그러나 이러한 관심과 기대에 비해 국내에서 식물 유래 다당류와 이들의 생물활성에 관한 연구는 타 연구에 비해 상대적으로 미흡한 것이 사실이며 다당류 및 면역 활성화에 대한 지속적인 연구만이 향후 이들을 건강 유지에 유용한 물질로 재창조할 수 있다고 사료됨.
- 이러한 측면에서 “PEF 처리 십자화과 식물들의 면역 및 항암활성 비교 평가” 과제는 아직도 미진한 동 분야의 국내 연구 수준의 향상을 위해서 뿐 아니라, 값싼 부산물로부터 고부가가치의 기능 식품소재의 개발측면에서도 의미하는 바가 크다고 판단됨.

제 3 장 연구수행 내용 및 결과

D-05

제 1 절 <제1세부기관(주관) : 비케이바이오> 십자화과 품종별 특성 파악 및 평가법 확립과 최적 공정 개발을 통한 산업화

1. 면역증강 성분의 분석법을 확립하여 제품 표준화 및 규격 설정을 위한 표준마련

가. 표준화 분석법을 통한 원료별 물리, 화학적 품질 및 특성 평가

(1) 표준화 분석법을 통한 십자화과 원료별 경도 및 물성 평가

- 십자화과 식물의 원료별 경도와 물성 평가를 위하여 Fig 9.과 같이 Texture Analyzer (T.A)와 TA9 Needle (1.0 mm D, 43 mm L)를 활용하여 품질을 평가하였음.
- 십자화과 식물의 전처리는 십자화과 식물(브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 무, 순무)을 수세 한 후 원물 중 T.A를 측정하기 적당한 부위를 다듬어서 Fig 10.와 같이 지름 1 cm Cork Borer를 활용하여 T,A 측정용 샘플을 만들어 관통 시 필요한 Load (g)값을 측정하였음.



Fig 9. Texture Analyzer (T.A)와 TA9 Needle (1.0 mm D, 43 mm L)



Fig 10. 지름 1 cm Cork Borer를 활용한 T.A 측정용 십자화과 식물

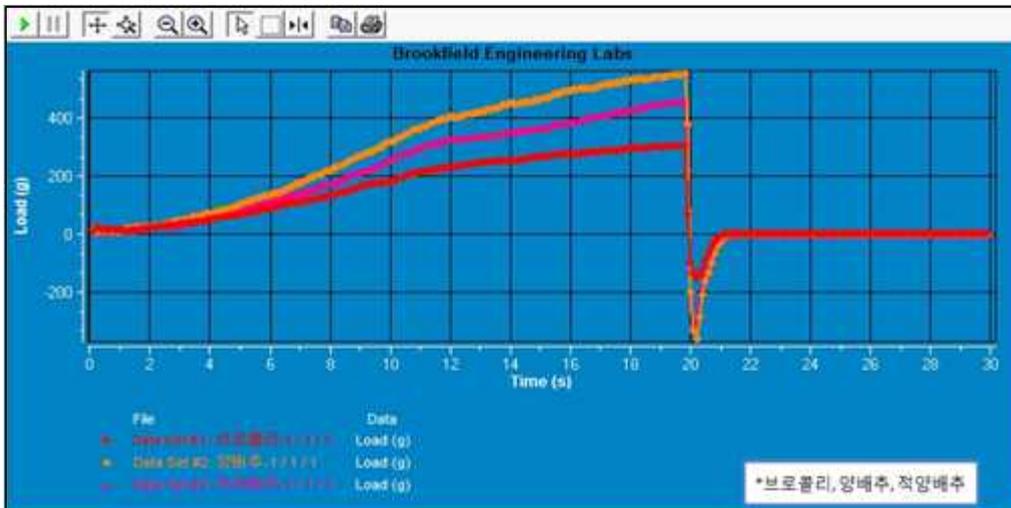


Fig 11. 브로콜리, 양배추, 적양배추의 Texture Analyzer 측정결과

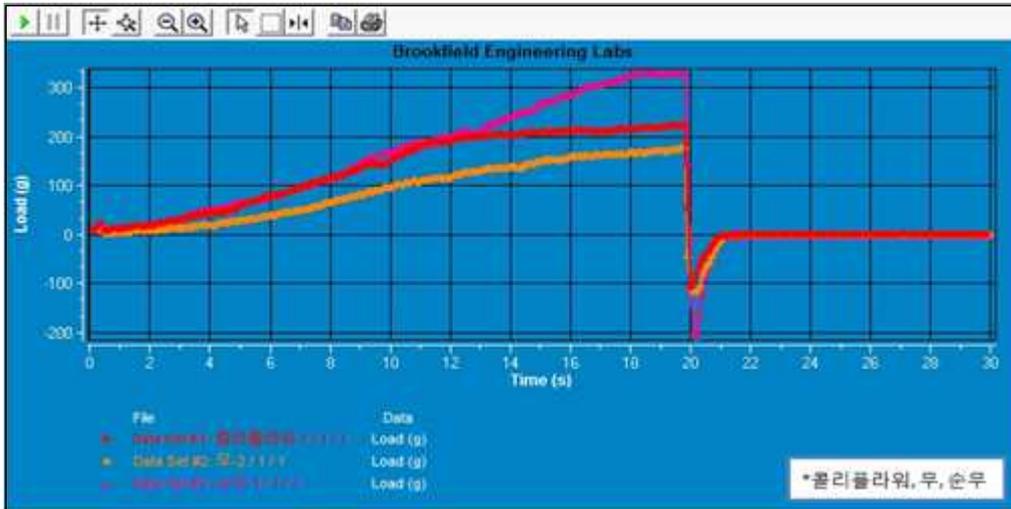


Fig 12. 콜리플라워, 무, 순무의 Texture Analyzer 측정결과

Table 2. 십자화과 식물의 texture analyzer 측정결과

| 구분 | 브로콜리 | 양배추 | 적양배추 | 컬리플라워 | 무 | 순무 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Max Load(g) | 299.7 | 547.3 | 452.7 | 212.2 | 176.3 | 357.2 |

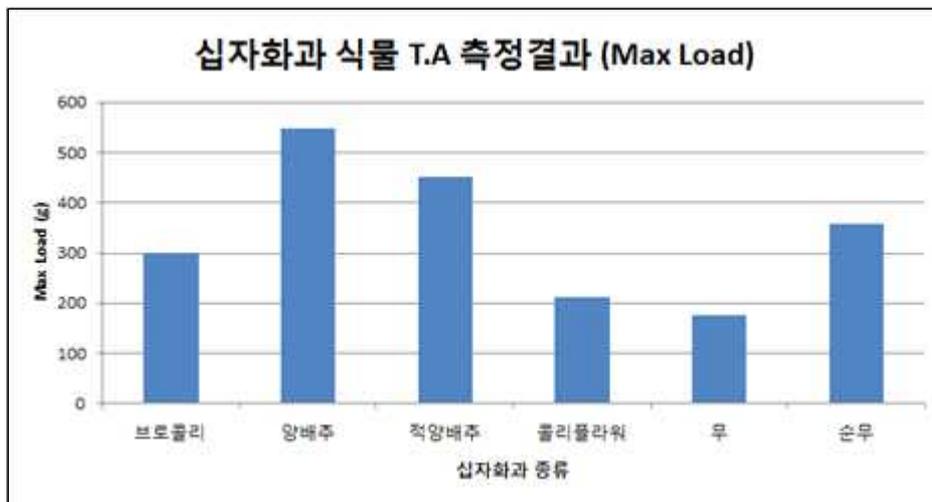


Fig 13. 십자화과 식물의 Max Load (g) 측정결과(Needle 사용)

- 십자화과 식물(브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 무, 순무)의 경도 및 물성 평가인 T.A를 측정된 결과 Fig 3.와 Fig 4.처럼 30 s에 걸쳐 조직의 관통에 필요한 Load (g)값이 측정 되었으며, 20 초에서 최대수치(Max Load)를 확인하였음.
- Table 1.의 Max Load (g)값을 비교해 보면, 양배추(547 g) > 적양배추(452 g) > 순무(357 g) > 브로콜리(299 g) > 콜리플라워(212 g) > 무(176 g) 순의 결과를 얻을 수 있었는데 이는 조직의 단단한 정도가 양배추가 가장 강하고 무가 가장 조직이 무르다는 것을 나타내었음.

(2) 표준화 분석법을 통한 십자화과 원료별 pH, 수분, 색가 평가

- 십자화과 식물의 원료별 품질 평가를 위하여 pH, 수분, 색가를 측정하였음.
- pH의 경우 십자화과 식물(브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 무, 순무)을 착즙기를 통해 얻은 착즙액을 METTLER TOLEDO 제품인 pH meter를 이용하여 pH를 측정하였음.
- 수분측정의 경우 십자화과 식물(브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 무, 순무)을 같은 후 각각의 시료를 0.5~1g 취한 후 OHAUS/MB45 제품인 수분측정기를 이용하여 수분 함량을 측정하였다.
- 색가의 경우 십자화과 식물(브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 무, 순무)을 같은 것과 착즙기를 통해 착즙을 실시하여 얻은 착즙액을 Konicaminolta/CM-5 제품을 이용하여 액상(착즙액)과 고체(같은 것) 두 가지 상태로 명도(L*), 적색도(a*), 황색도(b*)를 측정하였음.

Table 3. 십자화과 식물의 수분, pH 측정결과

| 구분 | 브로콜리 | 양배추 | 적양배추 | 콜리플라워 | 무 | 순무 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 수분(%) | 85.51 | 88.55 | 88.67 | 90.99 | 92.59 | 87.05 |
| pH | 6.67 | 6.19 | 6.24 | 6.71 | 6.65 | 6.33 |

Table 4. 십자화과 식물의 색가 측정결과

| 구분 | L*(D65) | | a*(D65) | | b*(D65) | |
|-------|---------|-------|---------|-------|---------|--------|
| | 착즙액 | 같은것 | 착즙액 | 같은것 | 착즙액 | 같은것 |
| 브로콜리 | 31.53 | 63.14 | -5.86 | -7.96 | 50.81 | 34.05 |
| 양배추 | 35.76 | 68.74 | -5.16 | -3.38 | 55.49 | 29.49 |
| 적양배추 | 0.84 | 12.61 | 4.55 | 16.10 | 0.99 | -14.05 |
| 콜리플라워 | 44.08 | 82.06 | 5.63 | -0.11 | 40.58 | 17.82 |
| 무 | 72.21 | 68.05 | -0.23 | -3.52 | 27.52 | 15.99 |
| 순무 | 21.21 | 59.33 | 7.60 | 0.89 | 26.13 | 14.95 |

- 십자화과 식물(브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 무, 순무)의 수분과 pH를 측정한 결과 최소 브로콜리 (85.51%)에서 최대 무(92.59%)로 수분함량이 85% 이상임.
- 무와 콜리플라워 경우 90%이상 수분을 함유 하였으며, 브로콜리, 양배추, 적양배추, 순무가 85~90%로 수분을 함유하였음.
- pH의 경우 십자화과 모두 6~7 범위의 pH 이었으며, 콜리플라워가 6.71로 가장 높았고, 양배추가 6.19로 가장 낮은 pH를 확인하였음.

- 십자화과 식물의 명도(L*)는 착즙액과 같은 것 중에서 같은 시료의 경우가 무를 제외하고는 모두 높게 측정되었고, 무의 경우는 같은 것보다 착즙액이 더 명도가 높은 것으로 확인하였음.
- 착즙 액 에서는 무의 경우가 명도(72.21)가 가장 높았으나 같은 것의 경우에는 콜리플라워의 명도(82.06)가 가장 높은 것으로 측정 되었으며, 가장 낮은 명도(L*)는 착즙 액과 같은 것 모두 적양배추의 명도(착즙액 : 0.84, 같은 것 : 12.61)가 가장 낮게 측정되었음.
- 십자화과 식물의 적색도(a*)는 양배추, 적양배추의 경우 착즙 액 보다 같은 것이 더 적색도가 높았으나, 브로콜리, 콜리플라워, 무, 순무의 경우 착즙액보다 같은 것이 더 적색도가 낮게 측정되었음.
- 가장 높은 적색도(a*)는 착즙 액의 경우 순무의 적색도(7.60)가 가장 높게 측정되었으며, 같은 것의 경우 적양배추의 적색도(16.10)가 가장 높게 측정 되었고, 가장 낮은 적색도(a*)는 착즙 액과 같은 것 모두 브로콜리의 적색도(착즙액 : -5.86, 같은 것 : -7.96)가 가장 낮게 측정되었음.
- 십자화과 식물의 황색도(b*)는 착즙액이 같은 것에 비해 높게 나왔음. 동일 시료라도 가공처리에 따라 황색도가 다를 수 있는데 착즙공정이 같은 것 보다는 황색이 더 높게 나타남을 알 수 있었음.
- 가장 높은 황색도(b*)는 착즙 액의 경우 양배추의 황색도(55.49)가 가장 높게 측정 되었으며, 같은 것의 경우 브로콜리의 황색도(34.05)가 가장 높게 측정 되었고, 가장 낮은 황색도(b*)는 착즙 액과 같은 것 모두 적양배추의 황색도(착즙 액 : 0.99, 같은 것 : -14.05)가 가장 낮게 측정되었음.

(3) 표준화 분석법을 통한 십자화과 원료별 미생물 평가

- 십자화과 원료별 평가를 위해 미생물 분석을 실행하였으며, 미생물 분석은 일반 미생물과 대장균 군을 측정하였음.
- 미생물 분석에 사용된 배지는 3M Petrifilm 배지(일반세균 : AC , 대장균 군 : EC)를 사용하였음.
- 미생물 분석은 살균(70% Et-OH 침지)한 착즙기로 십자화과 원물의 착즙 액을 얻었으며, 착즙 액을 $1 \sim 10^4$ 까지 희석하여, 착즙액과 희석액을 film 배지(AC, EC)에 1 ml씩 첨가 하였고, 일반세균은 37°C에서 48 시간, 대장균 군은 37°C에서 24 시간 배양하였음.
- 미생물 배양이 완료된 film 배지는 회수하여 미생물 군수를 측정하였음.

Table 5. 십자화과 원료별 미생물균수 측정결과

(단위 : CFU/g)

| 구분 | 브로콜리 | 양배추 | 적양배추 | 콜리플라워 | 무 | 순무 |
|----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 일반세균(AC) | 6.2×10^3 | 3.9×10^4 | 9.4×10^3 | 5.6×10^3 | 8.1×10^4 | 9.9×10^3 |
| 대장균군(EC) | 1.4×10^2 | 10 > | 6×10^3 | 10 > | 10 > | 1.6×10^2 |

- 십자화과 원료별 미생물 균수측정을 실시한 결과 Table 4.와 같이 일반세균의 경우 모든 십자화과에서 10^3 이상의 일반세균이 측정 되었음. 대장균 군의 경우 양배추, 콜리플라워, 무의 경우 10 미만의 균수가 측정된 것에 반하여 브로콜리와 순무는 10^2 이 측정되었고 적양배추의 경우는 10^3 이 측정되었음.
- 원료별 물리,화학적 품질평가를 실시하여 십자화과 식물(브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 무, 순무)의 품질을 평가하였으며, 결과를 토대로 차년도 연구인 PEF 처리한 십자화과 식물의 물리,화학적 품질평가를 실시하여 비교하고자함.

나. 면역증강 성분 Sulforaphane와 전구체 glucosinolate의 HPLC/LC-MS법을 통한 분석법 표준화

(1) 면역증강 성분 Sulforaphane의 HPLC법을 통한 분석법 표준화

- 십자화과 식물의 면역증강 성분인 sulforaphane을 분석하기 위하여 sulforaphane 표준품(90%, Sigma)으로 표준 용액을 농도별로 제조하여 분석을 실시하였음.
- HPLC 장비는 YL9110 pump (Young Lin, Seoul, Korea)을 사용하였으며, YLClarity chromatography station system을 이용하여 정량분석을 하였음. Column은 C18(4.6×250 mm, ID 5 mm)을, sample 주입량은 10 μ L, column oven 온도는 37°C, 유속은 1.0 mL/min, detector로는 UV 205 nm를 사용하였음. 이동상은 Acetonitrile (solvent A)과 Distilled water (solvent B)를 Table 6에 나타낸 조건에 따라 분석을 시도하였음.

Table 6. Sulforaphane 분석을 위한 Mobile phase 조건 (Isocratic method)

| Method | Mobile phase (%) | |
|----------|------------------|-----------|
| | Solvent A | Solvent B |
| Method-A | 70 | 30 |
| Method-B | 50 | 50 |
| Method-C | 35 | 65 |

* Solvent A : Acetonitrile

* Solvent B : Distilled water

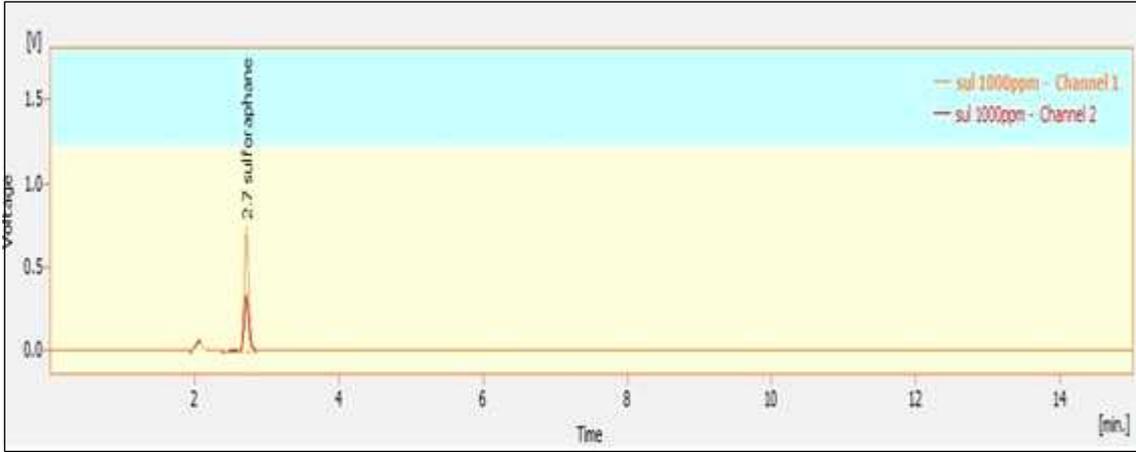


Fig 14. Method-A Mobile phase (ACN : D.W = 70 : 30) 조건의 sulforaphane 분석(R.T 2.7 min)

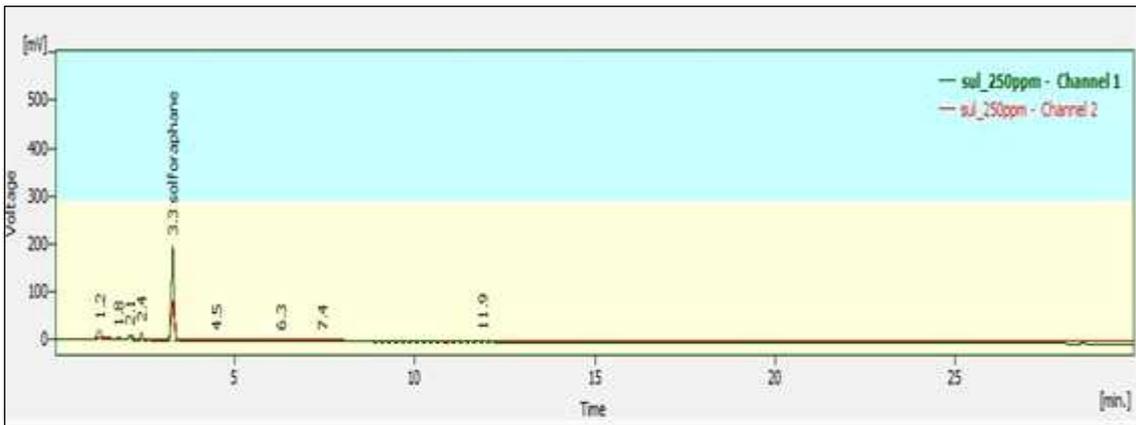


Fig 15. Method-B Mobile phase (ACN : D.W = 50 : 50) 조건의 Sulforaphane 분석 (R.T 3.3 min)

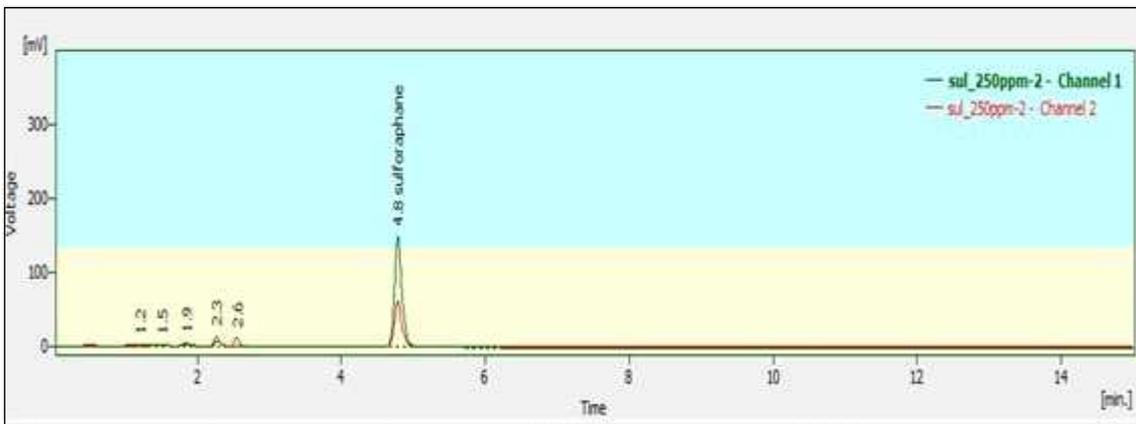


Fig 16. Method-C Mobile phase (ACN : D.W = 65 : 35) 조건의 sulforaphane 분석(R.T 4.8 min)

- Fig 14~16과 같이 sulforaphane 표준용액을 mobile phase 조건에 따라 머물름시간(retention Time)이 달라지는 것을 확인 하였다.
- Method-A의 경우 mobile phase 조건이 ACN : D.W = 70 : 30으로 유기용매인 ACN 비율이 높았으며, sulforaphane peak R.T값은 2.7 min임.
- Method-B의 경우 mobile phase 조건이 ACN : D.W = 50 : 50이며, sulforaphane [Peak] R.T값은 3.3 mindla.
- Method-A의 경우 mobile phase 조건이 ACN : D.W = 65 : 35으로 D.W 비율이 높았으며, sulforaphane [Peak] R.T값은 4.8 min임.
- Sulforaphane 표준시약을 mobile phase 조건 별로 분석을 실시해본 결과 유기용매(ACN)보다 D.W 비율이 높을 때 분석이 용이한 것으로 판단되었으며, 따라서 Method-C 조건을 선택하였음.
- Sulforaphane의 HPLC분석법 표준화를 위해 표준용액 25 ~ 1,000 ppm까지 분석을 실시하여 standard curve를 작성하였음.
- Sulforaphane의 LOD값을 선정하고, 표준용액 50 ppm을 9회 이상 반복 분석하여 LOQ 값을 선정하였음.

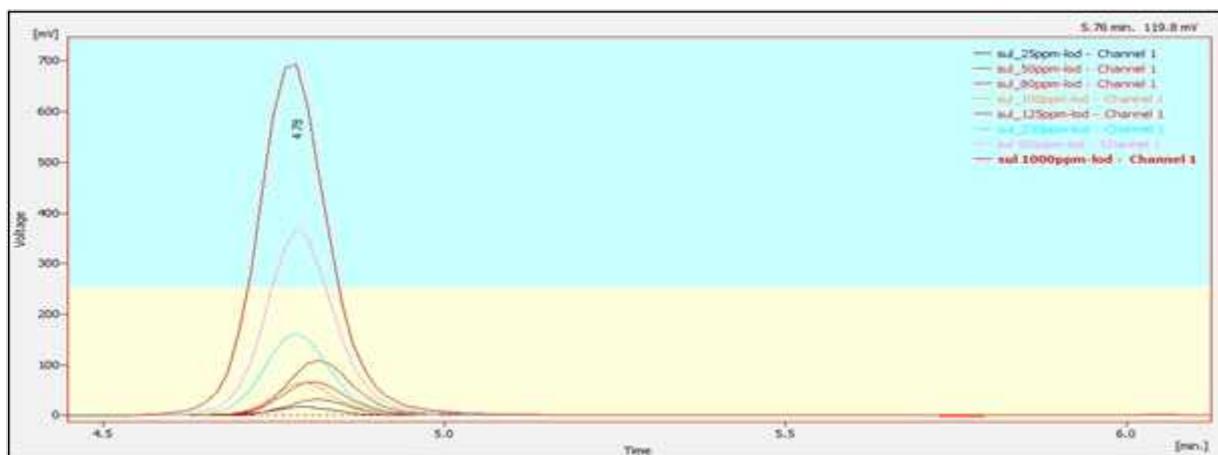


Fig 17. Sulforaphane 표준용액 25 ~ 1000 ppm을 HPLC로 분석한 chromatogram

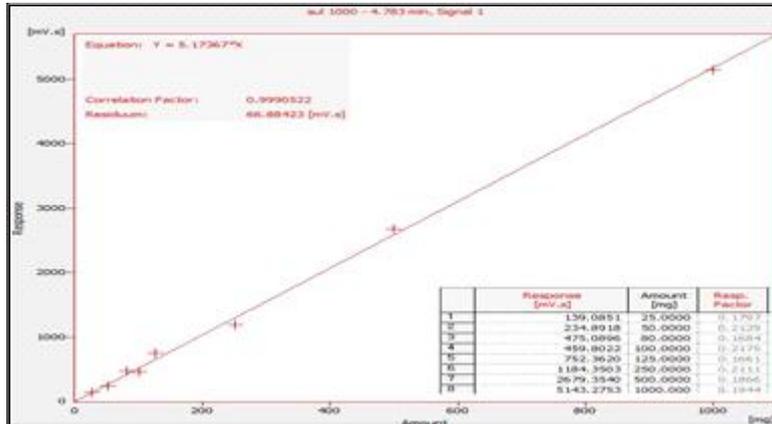


Fig 18. Sulforaphane 표준용액 25 ~1000ppm의 Standard Curve

Table 7. Sulforaphane 표준용액 50 ppm 반복분석 결과

| 구분 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 평균 | 표준편차 | LOQ |
|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| Sulforaphane | 45.4 | 54.5 | 52.6 | 49.4 | 52.5 | 49.8 | 50.9 | 45.1 | 51.8 | 50.2 | 3.2 | 32 |

- Sulforaphane 표준용액 25 ~ 1,000 ppm을 HPLC 분석한 결과 Fig 17과 같이 R.T 4.8 min으로 분석되었으며, 25 ppm 이하의 표준용액의 경우 검출이 불가하여 LOD 농도는 25 ppm임.
- Sulforaphane 표준용액 25 ~ 1,000 ppm의 standard curve는 Fig 18과 같이 작성 되었으며, 농도에 유의적으로 증가됨을 확인 하였으며, $R^2 = 0.9990$ 으로 직선성을 확인하였음.
- Sulforaphane 표준용액 50 ppm을 9회 반복 분석한 결과 평균 50.2 ppm으로 정량됨을 확인 하였으며, LOQ 값의 경우 32 ppm으로 확인하였음.

(2) Sulforaphane 전구체인 glucoraphanin의 HPLC법을 통한 분석법 표준화

- Sulforaphane 전구체인 glucoraphanin을 분석하기 위하여 glucoraphanin의 칼륨염(glucoraphanin supplied as K salt) 표준품(87%, Phyto Lab)으로 표준용액을 제조하여 분석하였음.
- Glucoraphanin 성분의 HPLC분석은 sulforaphane과 동일한 HPLC System과 동일한 Method-C 조건(ACN : D.W = 35 : 65)으로 분석을 실시하였음.
- Glucoraphanin의 HPLC분석법 표준화를 위해 표준용액 13 ~ 1,700ppm까지 분석을 실시하여 standard curve를 작성하였음.
- Glucoraphanin의 LOD값을 선정하고, 표준용액 53 ppm을 8회 이상 반복 분석하여 LOQ값을 선

정하였음.

- 십자화과 식물의 면역증강 성분인 sulforaphane과 전구체인 glucoraphanin의 HPLC법을 통한 동시분석의 가능성을 확인하기 위하여 두 가지 성분의 혼합 표준용액 120 ppm을 분석하였음.

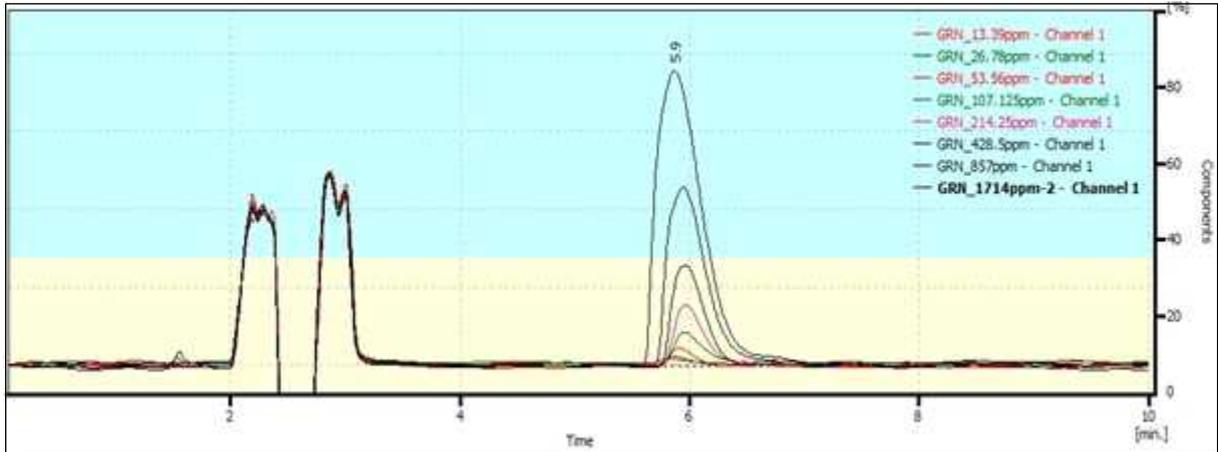


Fig 19. Glucoraphanin 표준용액 13 ~ 1,700 ppm을 HPLC로 분석한 chromatogram

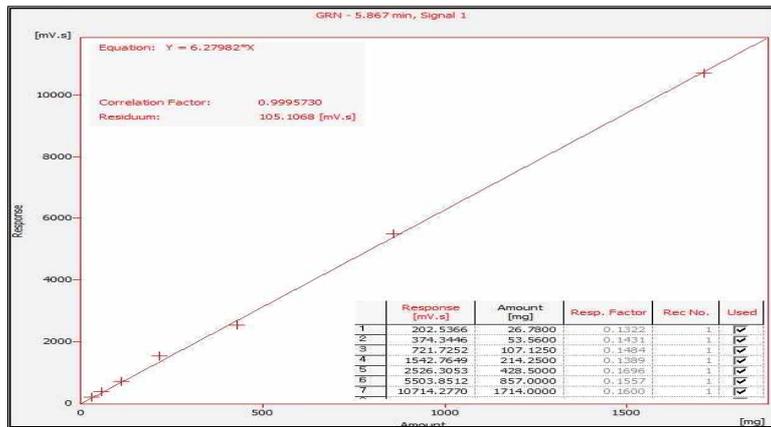


Fig 20. Glucoraphanin 표준용액 13 ~ 1,700 ppm의 standard curve

Table 8. Glucoraphanin 표준용액 53.56 ppm 반복분석 결과

| 구분 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 평균 | 표준편차 | LOQ |
|--------------------|------|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Sulforaphane (ppm) | 59.6 | 59 | 66.4 | 61.5 | 61.6 | 63.8 | 58.7 | 45.6 | 59.5 | 6.1 | 61.8 |

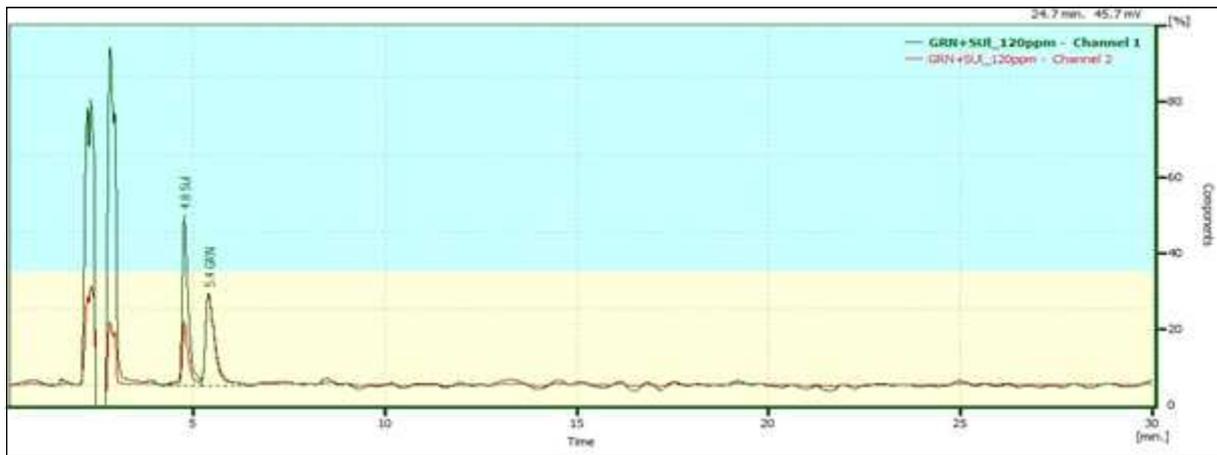


Fig 21. Sulforaphane과 glucoraphanin 표준용액 120 ppm의 HPLC 동시분석

- Glucoraphanin 표준용액 13 ~ 1,700 ppm을 HPLC 분석한 결과 Fig 19와 같이 R.T 5.9 min으로 분석되었으며, 13 ppm 이하의 표준용액의 경우 검출이 불가하여 LOD농도는 13 ppm임.
- Glucoraphanin 표준용액 13 ~ 1,700 ppm의 standard curve는 Fig 20와 같이 작성 되었으며, 농도에 유의적으로 증가됨을 확인 하였으며, $R^2 = 0.9995$ 으로 직선성을 확인하였음.
- Glucoraphanin 표준용액 53.56 ppm을 8회 반복 분석한 결과 평균 59.5 ppm으로 정량됨을 확인 하였으며, LOQ 값의 경우 61.8 ppm으로 확인하였음.
- Sulforaphane과 glucoraphanin 표준용액 120 ppm을 HPLC로 동시 분석한 결과 Fig 13.과 같이 sulforaphane의 R.T 값은 4.8 min이었고, glucoraphanin의 R.T값은 5.4 min으로 두 가지 성분이 분리됨을 확인하였고, 동시분석이 가능함.

(3) 십자화과 식물 추출물의 HPLC법을 통한 분석

- HPLC 분석을 하기위한 십자화과는 무, 순무, 양배추, 적양배추, 컬리플라워, 방울양배추, 브로콜리가 사용되었음.
- 십자화과 추출물은 원물 100 g에 물 200 mL을 첨가하여 갈은 후 40°C에서 2 h 동안 myrosinase에 의하여 glucoraphanin이 sulforaphane으로 전환되도록 유도하였으며, 효소반응 유도 후 Me-OH 800 mL을 첨가하여 2 h 동안 교반 추출 후 상등액을 0.45 µm filter로 여과하여 얻어진 추출액을 HPLC로 분석하였음.

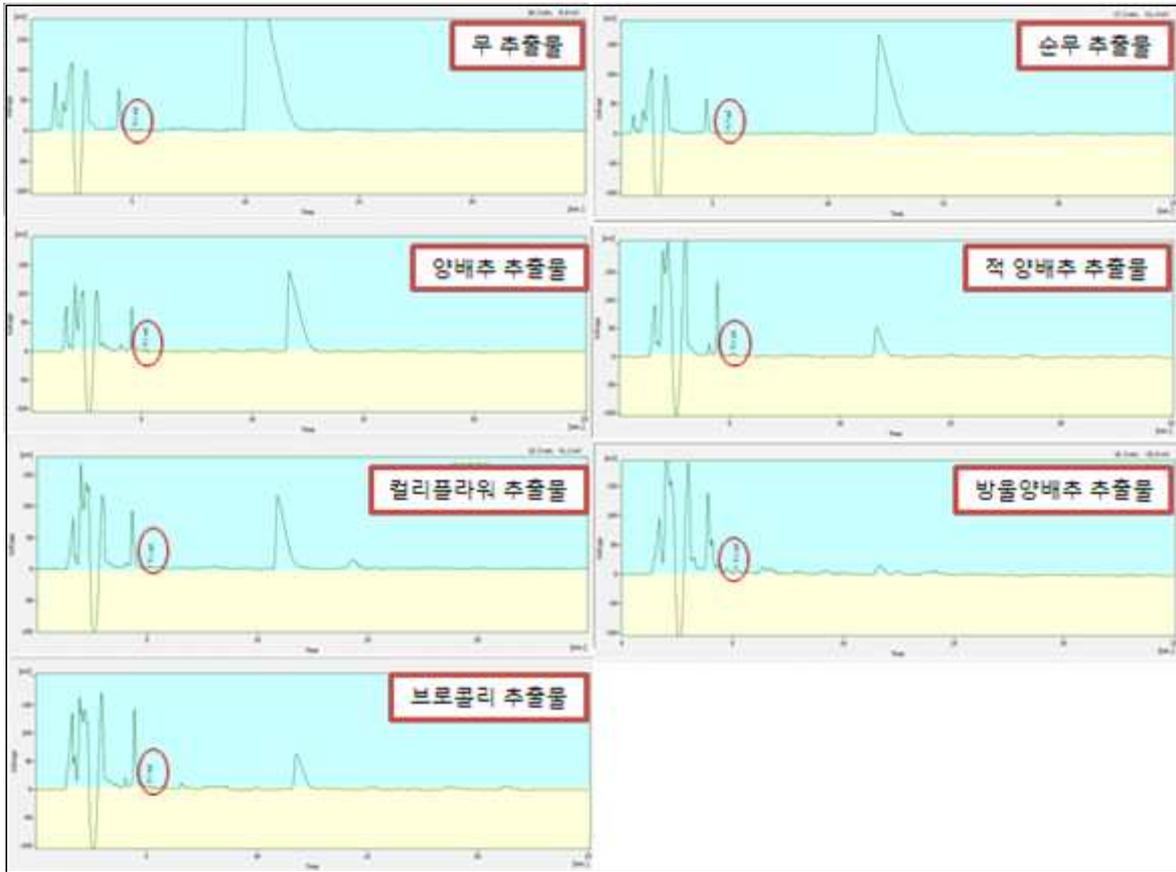


Fig 22. 십자화과 추출물(무, 순무, 양배추, 적양배추, 컬리플라워, 방울양배추, 브로콜리)의 HPLC분석

- 십자화과 추출물의 HPLC분석한 결과 sulforaphane의 함량이 십자화과 내에서 미량이기 때문에 정량분석을 하기에는 다소 어려움이 있어 HPLC보다 미량분석이 가능한 UPLC를 통하여 분석을 시도하였음.

(4) 면역증강 성분 sulforaphane과 glucoraphanin의 UPLC법을 통한 분석법 표준화

- UPLC 장비는 Acquity UPLC system (Waters corporation, milford, MA), Binary solvent manager, Sample manager로된 시스템이며, column은 ACQUITY UPLC[®] BEH C18(2.1 × 100 mm, 1.7 μm)을, sample 주입량은 3 μL, column oven 온도는 40°C, 유속은 0.3 mL/min, detector로는 PDA 190 ~ 400 nm를 사용하였다. 이동상은 acetonitrile in 0.1% formic acid (solvent A) 과 distilled water in 0.1% formic acid (solvent B)를 Table 9에 나타난 조건에 따라 분석을 시도하였음.

Table 9. Sulforaphane과 Glucoraphanin 분석을 위한 UPLC Gradient 조건

| Time (min) | Mobile phase (%) | |
|------------|------------------|-----------|
| | Solvent A | Solvent B |
| 0 | 1 | 99 |
| 1 | 1 | 00 |
| 6 | 60 | 40 |
| 7.5 | 1 | 99 |
| 11 | 1 | 99 |

* Solvent A: Acetonitrile (0.1% Formic acid)

* Solvent B: Distilled water (0.1% Formic acid)

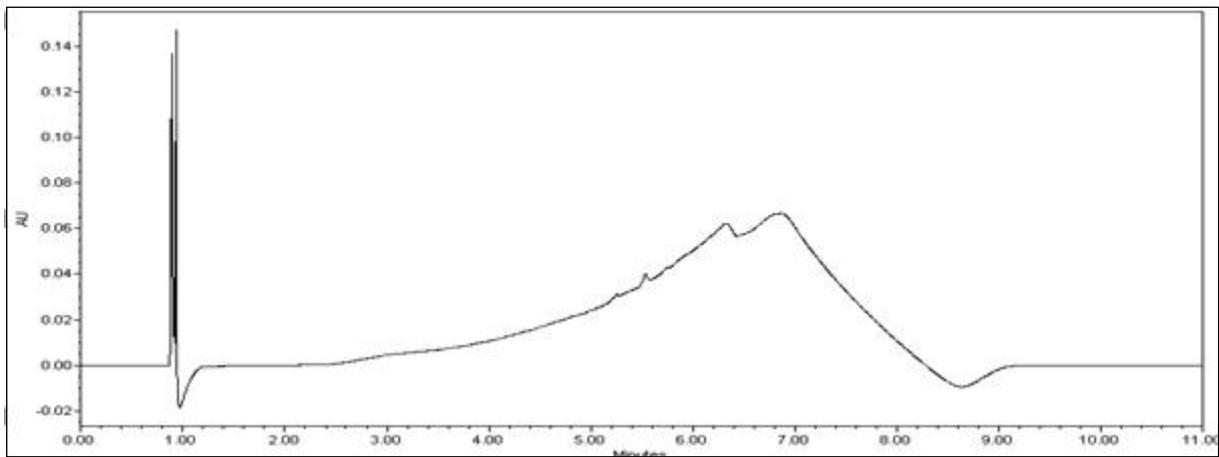


Fig 23. Blank (ACN)의 UPLC Chromatogram

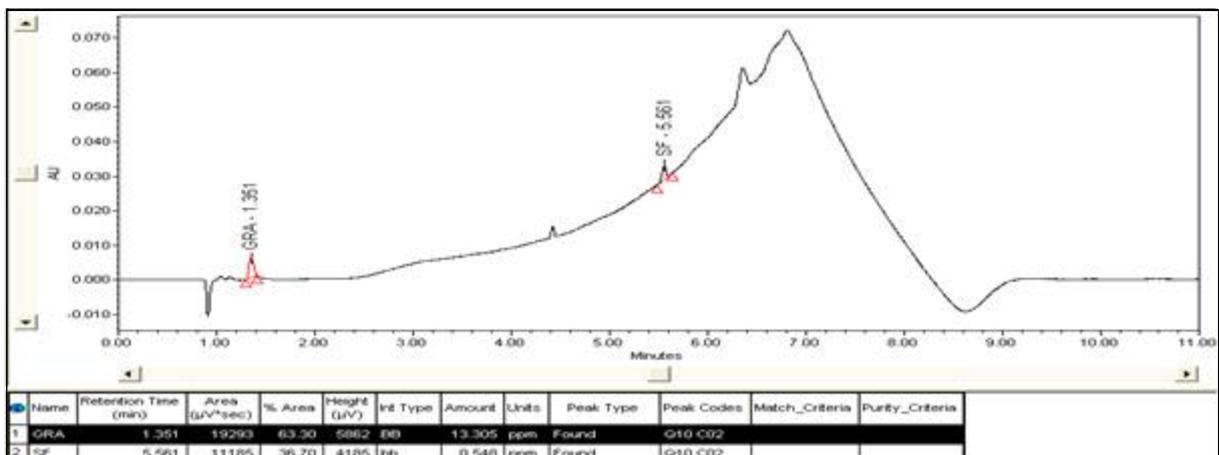


Fig 24. Sulforaphane과 glucoraphanin 표준시약의 UPLC chromatogram

○ Sulforaphane과 glucoraphanin 표준시약을 Table 9와 같은 조건에서 분석을 한 결과

Sulforaphane은 R.T 5.5min이고, glucoraphanin은 1.3min으로 두가지 성분이 분리됨을 확인하였음.

(5) Sulforaphane과 Glucoraphanin의 UPLC분석법 확립과 브로콜리 추출물 분석

- 십자화과 식물의 면역증강 성분인 sulforaphane과 전구체인 glucoraphanin의 UPLC법을 통한 동시분석을 확립하기 위하여 두 가지 성분이 혼합된 표준시약 10 ~ 500 ppm까지 UPLC분석하여 standrad curve를 작성하였음.
- Sulforaphane과 glucoraphanin의 LOD값을 선정하고, 표준용액 30 ppm을 8회 이상 반복 분석하여 LOQ값을 선정하였음.
- 브로콜리 추출물은 원물 100 g에 물 200 mL을 첨가하여 갈은 후 40℃에서 2 h 동안 glucoraphanin 성분이 sulforaphane으로 전환되도록 유도 하였으며, 효소반응 유도 후 methanol 800 mL을 첨가하여 2 h 동안 교반 추출 후 상등액을 0.45 μm filter로 여과하여 얻어진 추출액을 UPLC로 분석하였음.

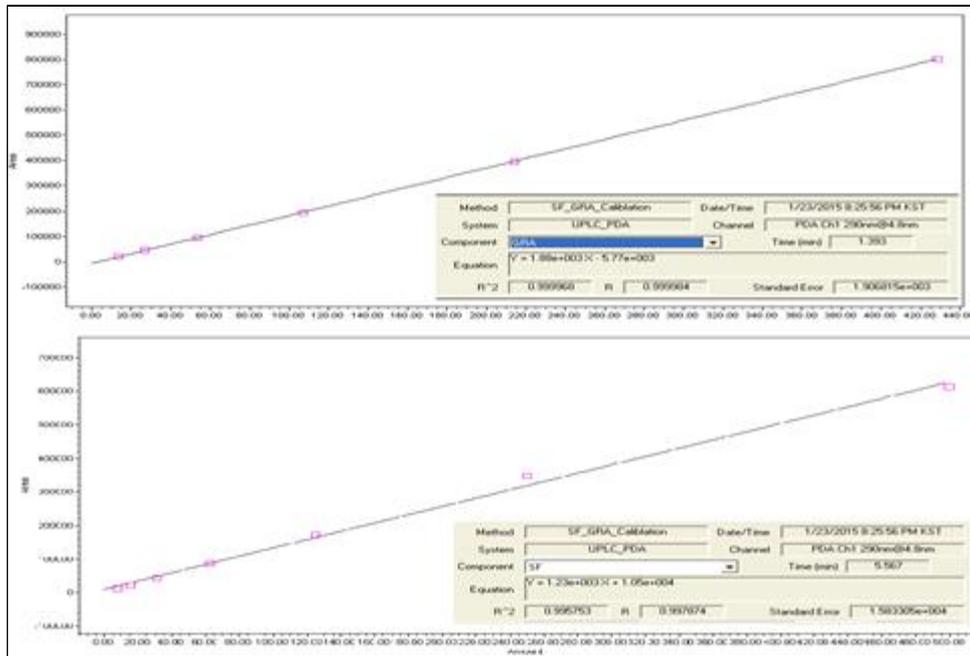


Fig 25. Sulforaphane과 glucoraphanin 표준용액(10 ~ 500 ppm)의 standard curve

Table 10. Sulforaphane과 Glucoraphanin 표준용액 30ppm 반복분석 결과

(단위 : ppm)

| 구분 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 평균 | 표준편차 | LOQ |
|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Sulforaphane | 31.3 | 34.1 | 28.8 | 27.7 | 30.4 | 31.7 | 31.5 | 29.2 | 30.6 | 2 | 20.1 |
| Glucorapanin | 32.4 | 33.2 | 29.5 | 27.8 | 30.7 | 31.2 | 33.4 | 28.9 | 30.9 | 2.1 | 20.5 |

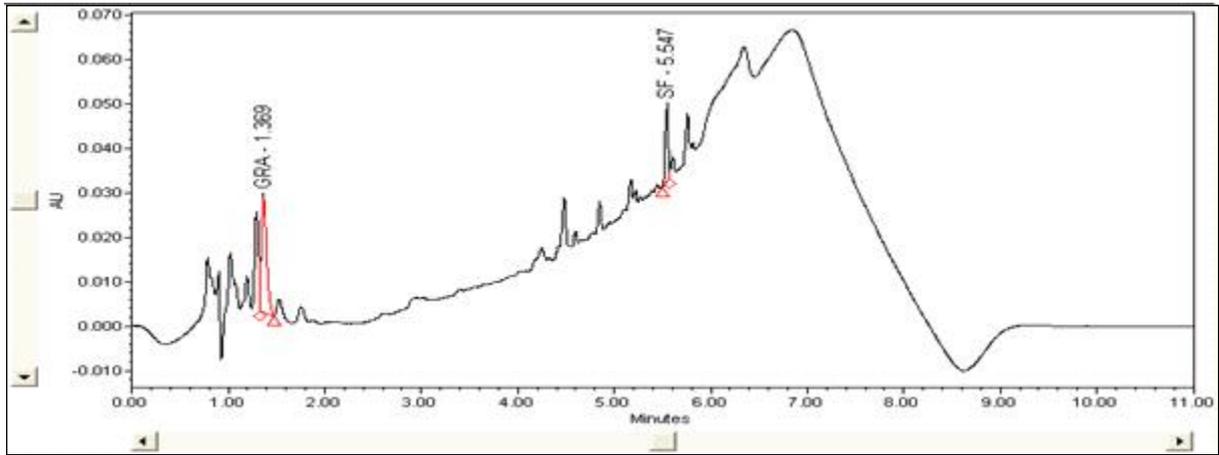


Fig 26. 브로콜리 추출물의 UPLC 분석

- Sulforaphane과 glucoraphanin 표준용액 10 ~ 500 ppm의 standard curve는 Fig 25와 같이 작성되었으며, 농도에 유의적으로 증가됨을 확인하였음.
- Sulforaphane과 glucoraphanin 표준용액 30 ppm을 8회 반복 분석한 결과, sulforaphane은 30.6 ppm, glucoraphanin은 30.9 ppm으로 정량됨을 확인 하였으며, LOQ 값의 경우 sulforaphane은 20.1 ppm, glucoraphanin은 20.5 ppm으로 분석되었음.
- 표준품 sulforaphane과 glucoraphanin의 정량분석이 가능하나 시료중의 두 성분을 분석할 경우, 인접한 성분들의 peak에 의해 정확한 분석을 위하여 정제 후 분석이 필요하였음.

(6) SPE 정제법 표준화를 위한 sulforaphane의 UPLC분석법 확립

- 십자화과내 미량성분인 sulforaphane의 정량분석을 하기 위해서 SPE (Solid Phase Extraction) 전처리 방법을 사용하였음.
- SPE 전처리 방법을 사용하여 sulforaphane을 분석할 경우 근접한 성분 Peak의 영향을 받지 않기 때문에 기존에 분석하였던 Gradient 분석방법(Table 11)에서 isocratic 분석방법(Table 10.)으로 변경하여 분석시간을 단축하였음.
- UPLC는 동일한 장비와 동일한 column을 사용 하였으며, sample 주입량은 3 μ L, column oven 온도는 40 $^{\circ}$ C, 유속은 0.3 mL/min, detector로는 PDA 190 ~ 400 nm를 사용하였음. 이동상은 acetonitrile in 0.1% formic acid (solvent A)과 distilled water in 0.1% formic acid (solvent B)를 Table 10.에 나타낸 조건에 따라 분석을 시도하였음.
- Sulforaphane의 UPLC 분석방법을 확립하기 위하여 표준시약 10 ~ 1,000 ppm까지 분석하여 standard curve를 작성하였음.

Table 11. Sulforaphane 분석을 위한 UPLC mobile phase 조건

| Time (min) | Mobile phase (%) | |
|------------|------------------|-----------|
| | Solvent A | Solvent B |
| 0 | 20 | 80 |
| 5 | 20 | 80 |

* Solvent A: Acetonitrile (0.1% Formic acid)

* Solvent B: Distilled water (0.1% Formic acid)

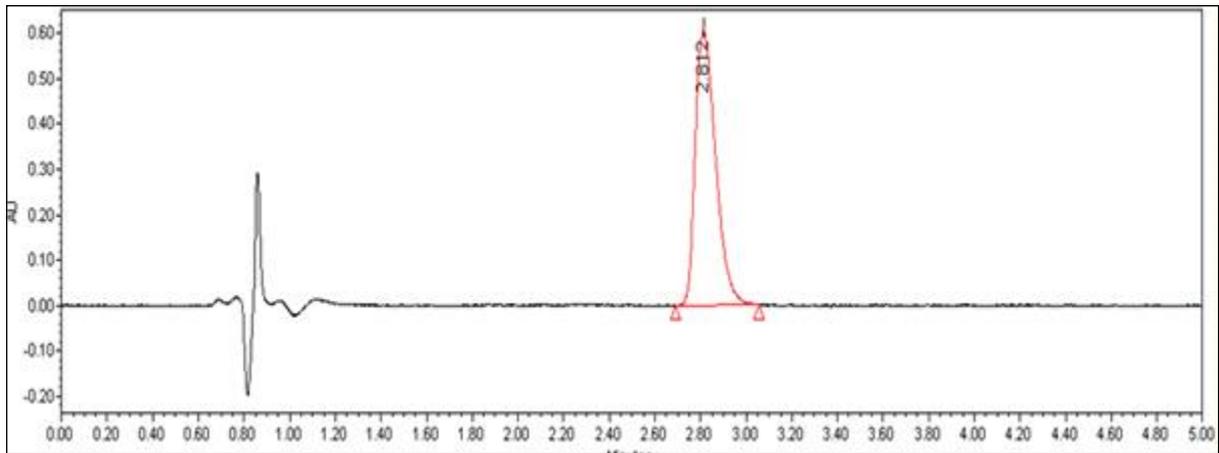


Fig 27. Sulforaphane 표준용액의 UPLC 분석

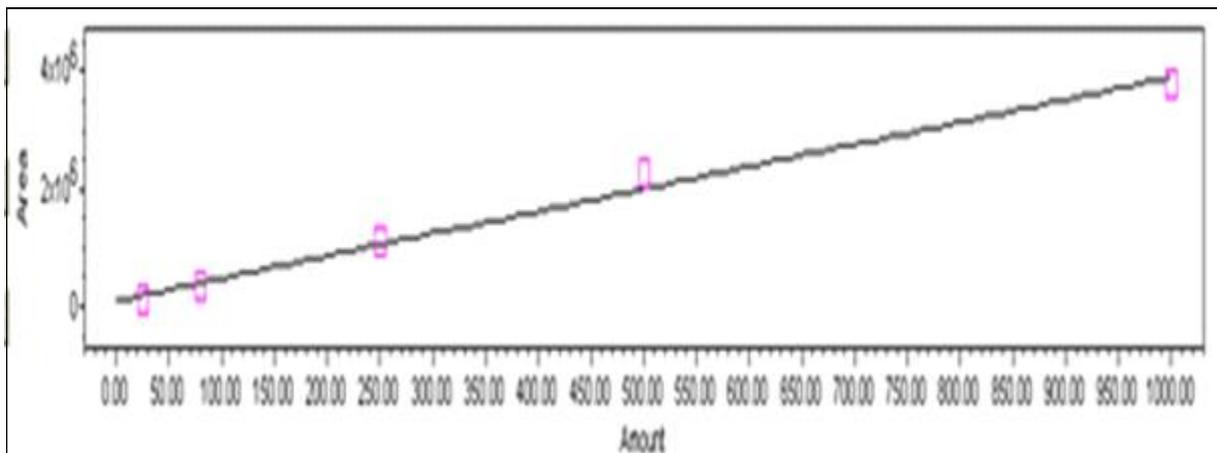


Fig 28. Sulforaphane 표준용액 10 ~ 1,000 ppm의 standard curve

○ Fig 27과 같이 Isocratic 분석방법을 통해 sulforaphane 표준용액을 분석한 결과 2.8 min의 R.T값으로 분석되는 것을 확인하였음.

- Sulforaphane 표준용액 10 ~ 1,000 ppm을 분석한 결과 Fig 29과 같이 농도에 유의적으로 standard curve가 작성되었음.

(7) Sulforaphane 추출물의 SPE정제법 표준화

- Sulforaphane 추출물 전처리를 위해 사용된 Cartridge는 MS-LLC (Silica, 1,000 mg, 6 mL)제품이 사용되었음.
- Cartridge condition은 ethyl acetate 20 mL 수세 후 methanol 20 mL로 활성화 시켰으며, 다시 ethyl acetate 20 mL로 안정화 시켰음.
- Sulforaphane 추출물은 대표적인 십자화과인 브로콜리를 ethyl acetate 10배수로 2 h 교반 추출하여 사용하였음.
- 대조군(Control) 브로콜리 추출물은 감압농축기로 전부 농축한 후 methanol 10 mL로 재용해하여 분석하였음.
- SPE 정제법을 활용한 브로콜리 추출물은 silica cartridge에 로딩하여 sulforaphane을 흡착시키고, ethyl acetate 10 mL로 cartridge를 수세한 후 methanol 10 mL로 sulforaphane을 회수하여 분석 하였음.

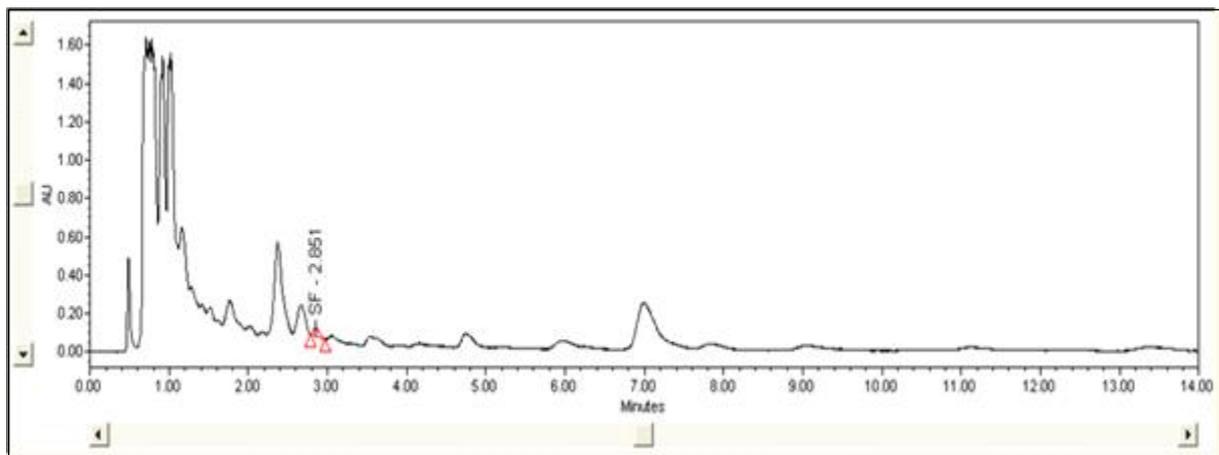


Fig 29. 대조군(Control) 브로콜리 추출물

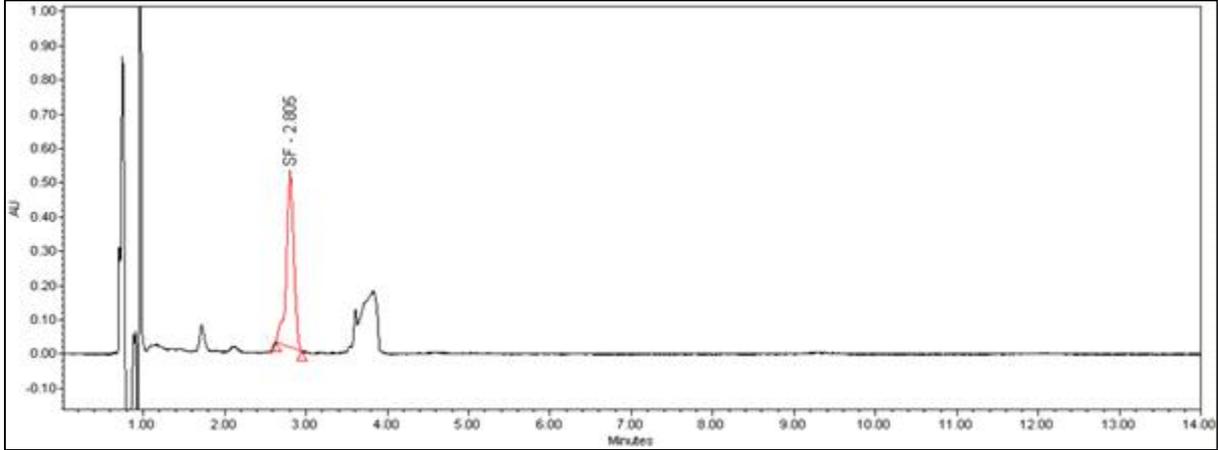


Fig 30. Sulforaphane 정제법을 활용한 브로콜리 추출물

- Fig 29 대조군(Control)의 경우 sulforaphane이 미량성분이기 때문에 인접한 다른 성분에 의해 정량분석이 어려운 반면, Fig 30의 sulforaphane 정제법을 활용한 브로콜리 추출물은 sulforaphane성분이 정제되어 정량이 용이하게 되었음.
- SPE 정제법을 활용한 sulforaphane 분석법을 표준화 하기위해 sulforaphane 과정시 발생하는 sulforaphane 손실과 회수율을 확인하기 위하여 추가실험을 진행하였음.
- Sulforaphane 100 ppm 추출물을 silica cartridge에 로딩 후 여액과 ethyl acetate 수세 후 여액을 분석하여 공정상에 손실을 확인 하였으며, 정제 후 추출물을 분석하여 sulforaphane 회수율을 확인하였음.

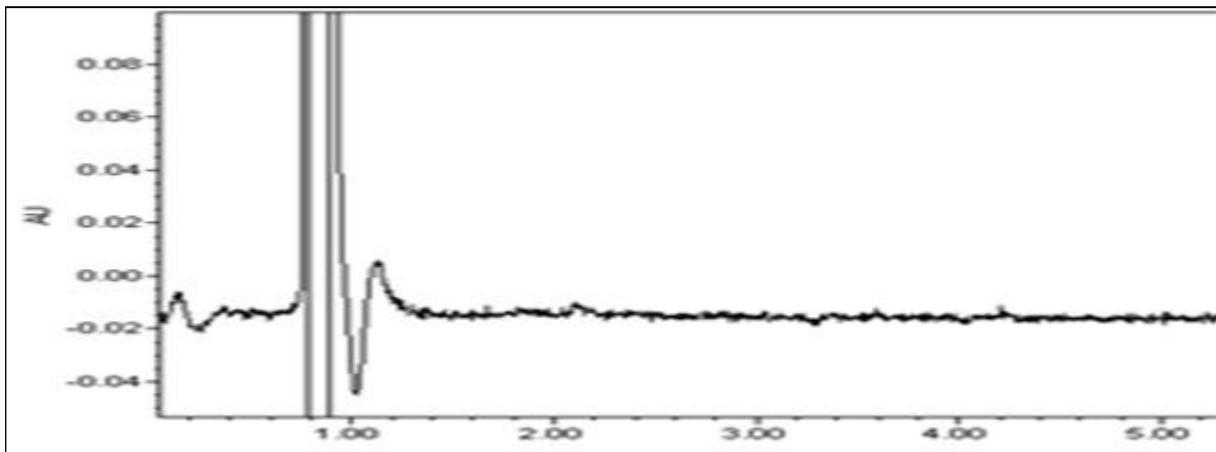


Fig 31. Sulforaphane 100 ppm 추출물 silica cartridge 로딩 한 filtrate

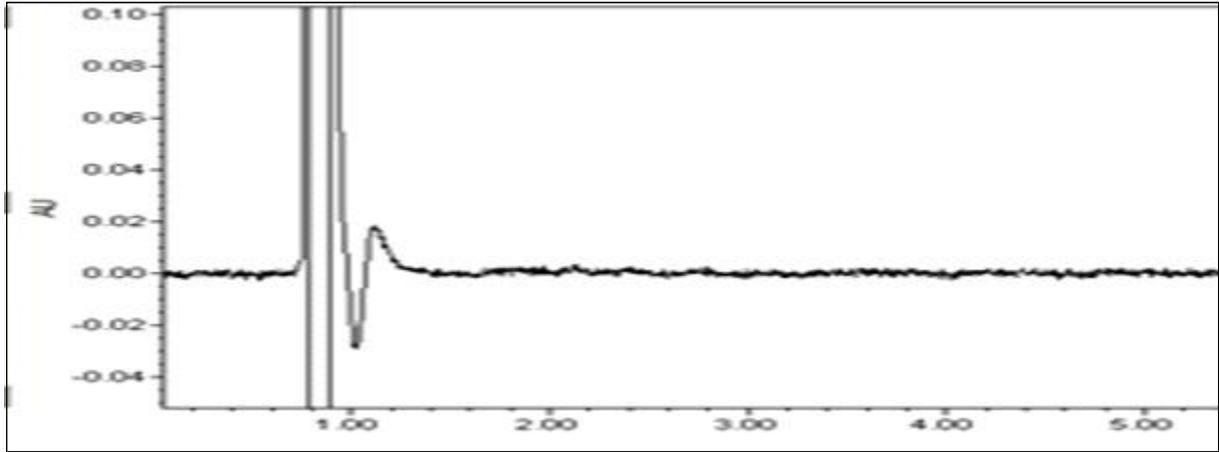


Fig 32. Sulforaphane 100 ppm 추출물 silica cartridge 수세한 세척액

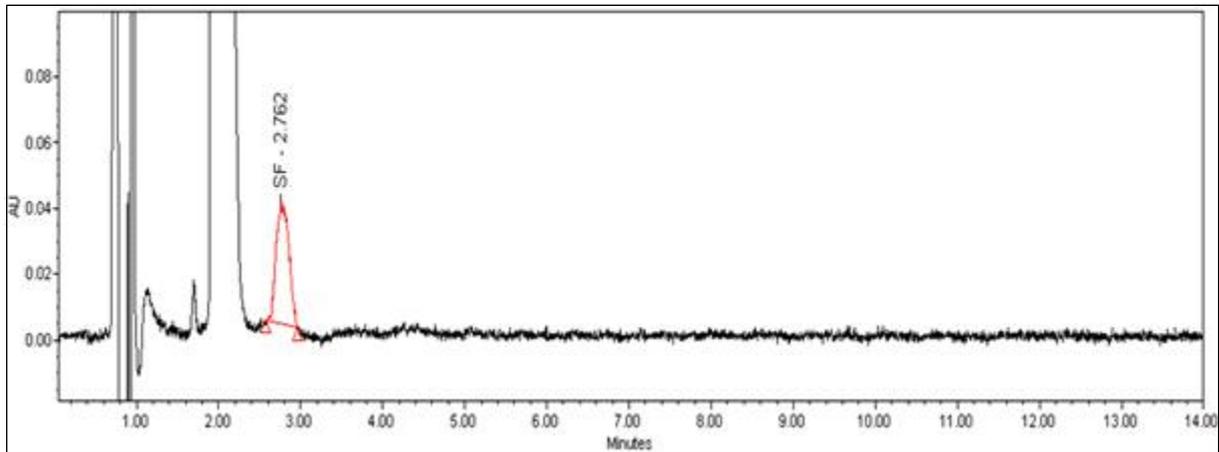


Fig 33. Sulforaphane 100 ppm 추출물 sulforaphane 용출액(elution) 분석 (SF : 90 ppm)

- Sulforaphane 추출물 sulforaphane 정제 공정별 분석한 결과 Fig 31. Fig 32와 같이 sulforaphane 정제 공정인 로딩과 수세 과정에서 sulforaphane 손실은 없는 것으로 확인되었음.
- Fig 33과 같이 sulforaphane 100 ppm을 sulforaphane 정제시 90 ppm이 회수되어 sulforaphane의 회수율이 90% 이상임을 확인하였음.
- SPE 정제방법에 사용되는 silica cartridge의 sulforaphane 최대 흡착량을 확인하기 위하여 추가 실험을 진행하였음.
- Sulforaphane 함량 100 mg/100 mL인 ethyl acetate 추출물 100 mL을 준비하여 silica cartridge에 20 mL씩 5회 로딩(sulforaphane 20 mg x 5회) 후 filtrate을 로딩 횟수 별로 분석 하였음.

Table 12. Sulforaphane (20 mg/20 mL x 5회) 로딩 후 Filtrate Sulforaphane 분석

| | 1차 | 2차 | 3차 | 4차 | 5차 | 합계 |
|------|----|------|------|------|----|-------|
| 흡착 양 | 20 | 39.8 | 57.8 | 72.3 | 0 | 189.9 |
| 손실 양 | 0 | 0.2 | 2.2 | 7.7 | 20 | 30.1 |

(단위 : mg)

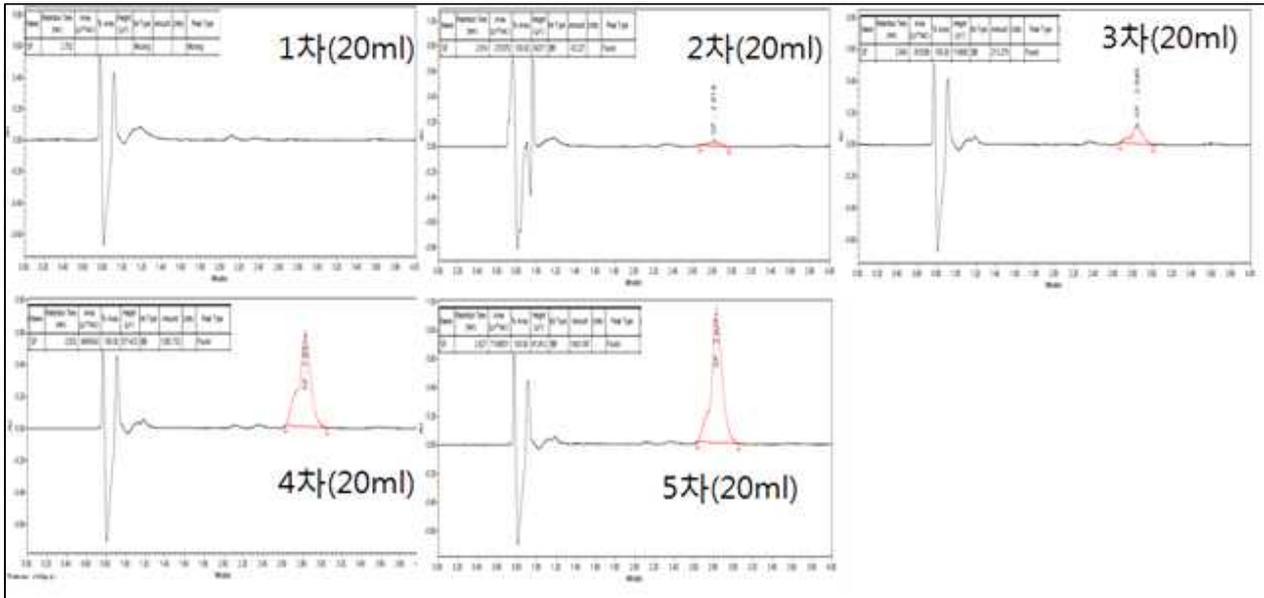


Fig 34. Sulforaphane (20 mg/20 mL x 5회) 로딩 후 여액 sulforaphane 분석

- Sulforaphane 정제에 사용되는 Silica cartridge (1,000 mg, 6 mL)의 sulforaphane 최대 흡착 양을 확인한 결과 Table 12과 같이 최대 흡착 양은 189.9 mg/1,000 mg 이며, 정량 분석시 sulforaphane 함량 39.8 mg 이하 추출물을 로딩해야함.

(8) Sulforaphane과 Glucorapganin의 UPLC-MS/MS 법을 통한 분석법 표준화

- UPLC-MS/MS 장비는 Fig 34와 같이 Acquity UPLC system (Waters corporation, milford, MA), Binary solvent manager, Sample manager로 된 시스템이며, MS system은 Waters Quattro Premier XE Tandem MS (Micromass UK limited), software는 Masslynx V4.1을 이용하였음.
- Column은 ACQUITY UPLC[®] BEH C18(2.1× 100 mm, 1.7 μm)을, sample 주입량은 3 μL, column oven 온도는 40℃, 유속은 0.3 mL/min를 사용하였음. 이동상은 acetonitrile in 0.1% formic acid (solvent A)과 distilled water in 0.1% formic acid (solvent B)를 Table 13의 조건에 따라 분석하였음.

- MS/MS Method는 Table 13와 같이 sulforaphane (MS 178 m/z -> Daughter 113.9 m/z)을 positive ion mode로 scan 하였으며, glucoraphanin은 (MS 436 m/z -> Daughter 372, 96.9 m/z)를 negative ion mode로 scan 하였음.
- Sulforaphane과 glucoraphanin의 UPLC-MS/MS 법을 통한 분석법 표준화를 위해 sulforaphane은 7~250 ppb 농도, glucoraphanin은 10~335 ppb 농도가 되도록 두 가지 성분을 혼합하여 동시 분석 하였으며, standard curve를 작성하였음.



Fig 35. UPLC-MS/MS (UPLC - Acquity system, MS/MS - Waters Quattro Premier XE Tandem)

Table 13. Sulforaphane과 Glucoraphanin 분석을 위한 UPLC-MS/MS Mobile Phase 조건

| Time (min) | Mobile phase (%) | |
|------------|------------------|-----------|
| | Solvent A | Solvent B |
| 0 | 55 | 45 |
| 2 | 55 | 45 |

Solvent A: Acetonitrile (0.1% Formic acid)

Solvent B: Distilled water (0.1% Formic acid)

Table 14. Sulforaphane과 glucoraphanin 분석을 위한 MS/MS 조건

| | MS Scan | Daughter Scan-1 | Daughter Scan-2 | Mode |
|---------------|---------|-----------------|-----------------|--------------|
| Sulforaphane | 178 | 113.9 | | Positive ion |
| Glucoraphanin | 436 | 372 | 96.9 | Negative ion |

(단위 : m/z)

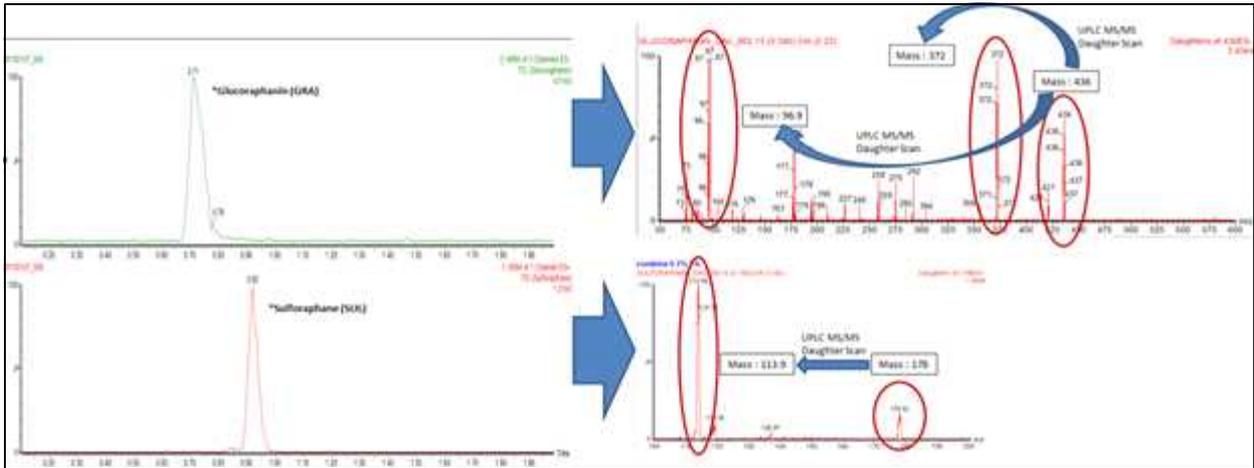


Fig 36. Sulforaphane과 glucoraphanin 표준용액의 UPLC-MS/MS분석

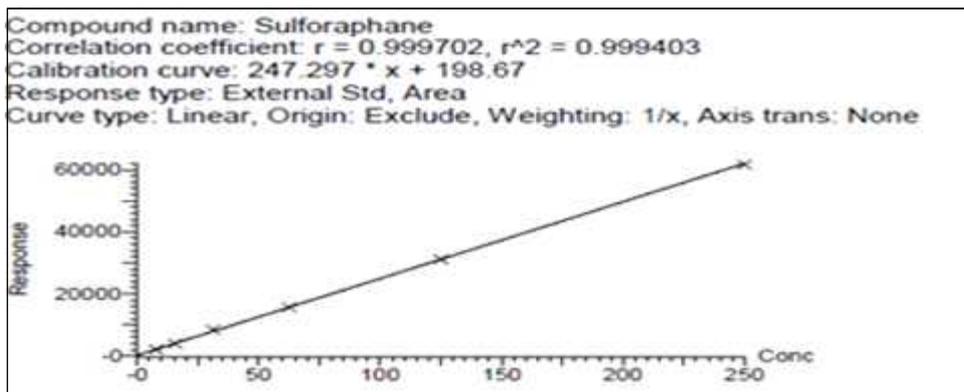


Fig 37. Sulforaphane 표준용액 7 ~ 250 ppb의 standard curve

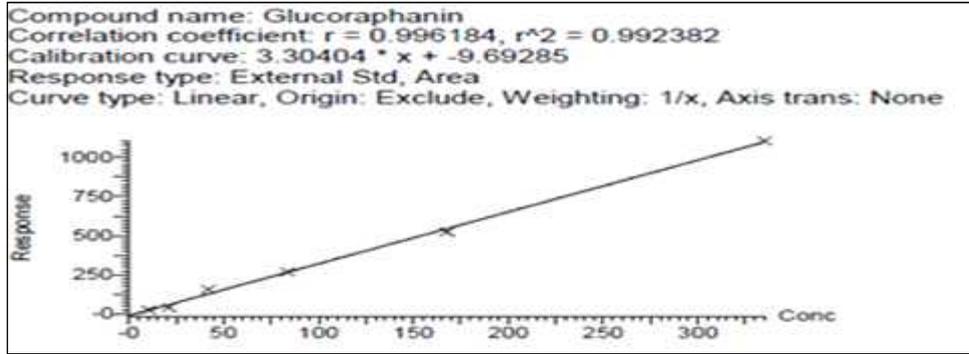


Fig 38. Glucoraphanin 표준용액 10 ~ 350 ppb의 standard curve

- Sulforaphane과 glucoraphanin의 UPLC-MS/MS분석 결과 Fig 36과 같이 sulforaphane의 경우 positive ion mode에서 R.T값 0.92 min으로 분석되었으며, glucoraphanin의 경우 negative ion mode에서 R.T값 0.71 min으로 분석되었음.
- 두 가지 성분은 각각 positive ion mode와 negative ion mode로 분석이 되고 R.T값 또한 겹치지 않아 UPLC-MS/MS 분석법을 통해 동시분석이 가능하였음.
- Sulforaphane 표준시약 7 ~ 250 ppb를 분석시 농도증가에 따라 유의적으로 area값이 상승하여 Fig 29와 같이 직선성을 나타내는 standard curve의 작성이 가능하였음.
- Glucoraphanin 표준시약 10 ~ 350 ppb를 분석시 농도증가에 따라 유의적으로 area값이 상승하여 Fig 39와 같이 직선성을 나타내는 standard curve의 작성이 가능하였음.
- UPLC-MS/MS장비를 이용한 분석방법이 가장 정확하고, sulforaphane 성분만을 분석할 때는 sulforaphane 정제 방법을 통한 UPLC분석도 가능하였음.

다. 십자화과 식물인 브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 순무, 무의 성체 및 싹 종류별 품종 연구

(1) 십자화과 식물의 품종별 Sulforaphane과 Glucoraphanin 함량비교를 위한 최적 추출조건 확립

- 십자화과 식물의 성체 및 싹 종류별 품종 별 연구를 하기 위하여 지표성분인 sulforaphane과 glucoraphanin의 함량분석을 하였음.
- 지표성분의 함량분석 이전에 우선 sulforaphane과 glucoraphanin의 추출 최적조건을 확립하기 위하여 십자화과의 대표적인 식물인 브로콜리를 Methanol 용매로 반복 추출을 진행하였음.

- 브로콜리의 반복추출에 따른 분석과 더불어 sulforaphane의 성분이 전구체인 glucoraphanin성분이 식물내 효소인 myrosinase에 의해 전환되는 성분이기 때문에 식물 내 myrosinase 효소반응을 유도한 처리군의 methanol 반복추출과 효소반응을 유도하지 않은 대조군(Control)의 methanol 반복추출물을 UPLC-MS/MS로 분석하였음.
- 효소반응을 유도한 처리군의 경우 같은 브로콜리 5 g에 물 10 mL을 첨가하여 myrosinase 효소 최적반응 조건인 40℃에서 2h 동안 glucoraphanin성분이 sulforaphane으로 전환되도록 효소반응을 유도 하였으며, 반응 완료 후 methanol 15 mL을 첨가하여 30분 동안 sonication방법으로 1차 추출을 진행하였음. 1차 추출 완료 후 원심분리(5,000 rpm, 10 min)를 통해 상등액을 회수 하였으며, 침전물에 methanol 40 mL을 첨가하여 30분 동안 sonication방법으로 2차 추출을 진행하였음. 3차 ~ 5차 추출의 경우 2차 추출 때와 동일한 방법으로 반복 추출을 진행 하였음.
- 효소반응을 유도하지 않은 대조군(Control)의 경우 같은 브로콜리 5 g에 methanol 25 mL을 첨가하여 myrosinase 효소를 불활성 시켰으며, 30 min 동안 sonication방법으로 1차 추출을 진행하였음. 2차 ~ 5차 추출의 경우 효소반응을 유도한 처리군의 2차 추출과 동일한 방법으로 반복 추출을 진행하였음.

Table 15. 효소반응 처리 유,무에 따른 SF과 GRA 반복추출물 분석

(단위 : ug)

| 성분 | 처리방법 | 1차추출 | 2차추출 | 3차추출 | 4차추출 | 5차추출 |
|----------------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Sulforaphane (누적 추출 양) | 대조군(Control) | 3.19 | 6.52 | 9.19 | 10.43 | 11.44 |
| | 처리군(Enzyme) | 24.40 | 46.54 | 55.40 | 58.61 | 59.32 |
| Glucoraphanin (누적 추출 양) | 대조군(Control) | 10.69 | 22.53 | 33.19 | 39.68 | 42.68 |
| | 처리군(Enzyme) | 2.88 | 7.42 | 12.55 | 17.63 | 21.36 |

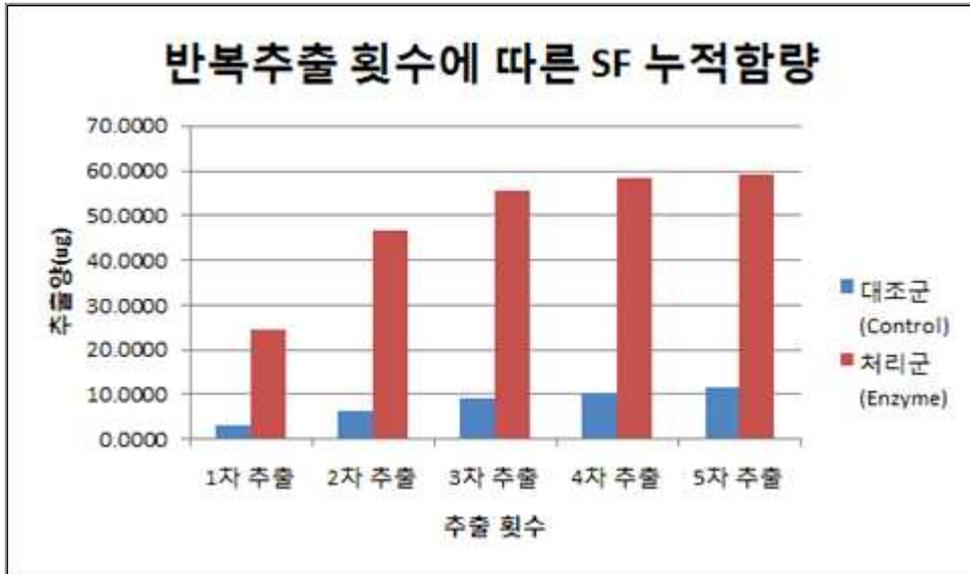


Fig 39. 브로콜리 반복추출 횟수에 따른 sulforaphane 누적합량

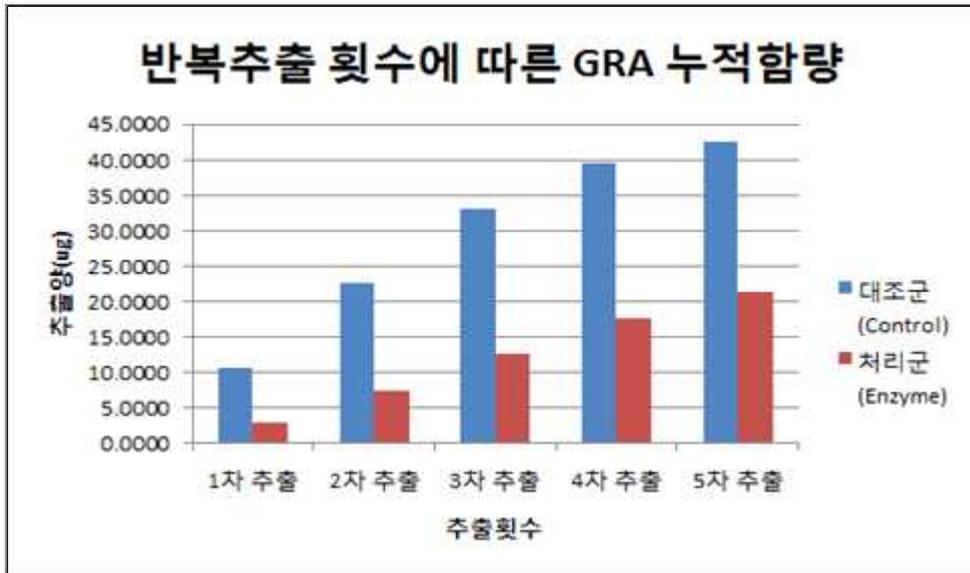


Fig 40. 브로콜리 반복추출 횟수에 따른 glucoraphanin 누적합량

- 브로콜리의 myrosinase 효소반응 유도 유무에 따른 sulforephane 추출 양을 보면 대조군 (Control)의 경우 myrosinase 효소반응의 유도가 없었기 때문에 sulforaphane의 함량이 11.4 μg 으로 다소 낮은 추출 양을 보인 반면 myrosinase 효소반응을 유도한 처리군(Enzyme)의 경우에는 glucoraphanin이 sulforaphane으로 전환되어 59.3 μg 으로 대조군에(Control)에 비해 5배 이상 sulforaphane이 전환되었음을 확인 할 수 있었다.
- 반면, Glucoraphanin 함량은 효소반응의 유도가 없었던 대조군(Control)이 42.6 μg 으로 효소반응의 유도가 있었던 처리군(Enzyme)의 추출함량 21.3 μg 보다 약 2배 더 남아 있음을 확인 할 수 있었음.

- Table 15와 같이 브로콜리의 반복 추출횟수에 따른 sulforaphane과 glucoraphanin의 누적 추출 양을 보면, 4차 추출까지 진행 했을 경우 브로콜리 내에 함유한 sulforaphane과 glucoraphanin을 90% 이상 추출이 가능 하였으며, 3차 추출 이상 진행하여야 sulforaphane과 glucoraphanin의 대부분을 추출 할 수 있음을 확인하였음.



Fig 41. 십자화과 식물의 glucoraphanin과 sulforaphane 분석방법 모식도

- 십자화과 식물의 지표성분인 glucoraphanin과 sulforaphane을 분석하기 위해서는 Fig 41과 같이 물을 2배 첨가하여 myrosinase 최적조건인 40°C에서 2h 동안 sulforaphane으로 전환을 유도 하여야함.
 - Glucoraphanin과 sulforaphane의 추출은 ethanol을 이용하여 총 3회 반복추출을 하며, 분석은 UPLC-MS/MS를 활용하여 동시분석을 실시함.
- (2) 십자화과 식물인 브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 순무, 무의 성체연구
- 십자화과 식물 품종간의 연구를 진행하기 위하여 우선 가장 쉽게 수급할 수 있는 십자화과 식물인 브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 순무, 무의 성체를 연구하였음.
 - 성체의 연구는 십자화과 식물의 기능성분인 sulforaphane을 지표성분으로 함량분석을 실시하였음.

- 십자화과 식물의 성체는 Fig 42과 같이 경기도 성남지역 마트에서 구매하여 연구에 사용하였음.
- 십자화과 성체는 Table 16과 같이 100g씩 다듬어서 믹서기로 갈은 후 물 200 mL을 첨가하여 4 0°C에서 2시간동안 myrosinase에 의한 sulforaphane 전환을 유도하였으며, methanol 300 mL을 추가하여 1차 추출을 진행하였고, methanol 800 mL로 2차 추출, 3차 추출을 진행하여 십자화과 성체 추출물을 제조하고 상등액을 0.2 μm filter로 여과한 후 희석하여 UPLC-MS/MS로 sulforaphane을 분석하였음.



Fig 42. 십자화과 원물 (브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 무, 순무)

Table 16. 추출 전 십자화과 식물 성체의 무게 및 수분함량

| | 브로콜리 | 양배추 | 적양배추 | 콜리플라워 | 순무 | 무 |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 성체무게(g) | 100.77 | 101.88 | 103.21 | 101.25 | 103.92 | 101.06 |
| 수분(%) | 89.16 | 91.29 | 91.91 | 91.43 | 91.67 | 94.24 |
| 건조중량(g) | 10.92 | 8.87 | 8.35 | 8.68 | 8.66 | 5.82 |

Table 17. 십자화과 식물 성체의 Sulforaphane 함량분석

(단위 : mg/100g D.W)

| | 브로콜리 | 양배추 | 적양배추 | 컬리플라워 | 순무 | 무 |
|-----------------|-------|------|-------|-------|------|------|
| Sulforaphane 함량 | 17.51 | 0.82 | 13.56 | 0.30 | 0.60 | 0.45 |

* D.W - Dry Weight

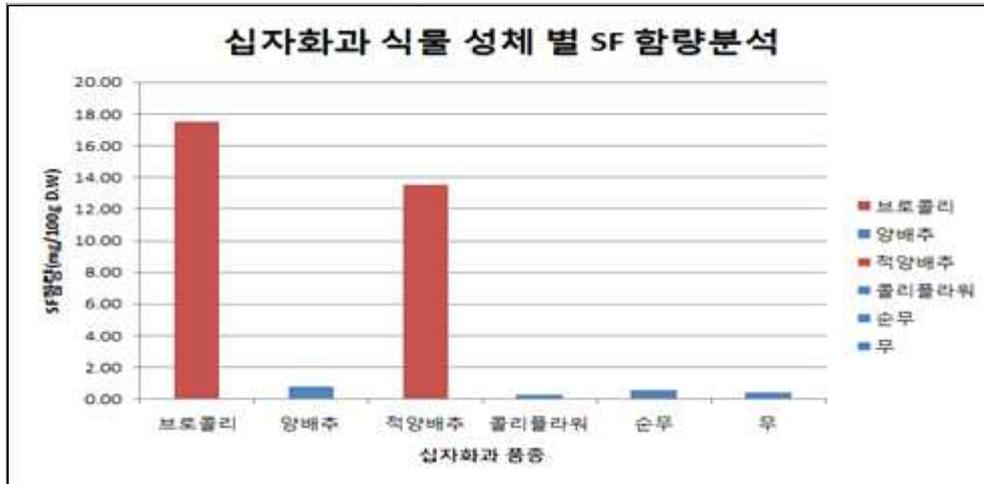


Fig 43. 십자화과 식물(브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 무, 순무)의 sulforaphane 함량

- 십자화과 식물 성체의 sulforaphane 함량분석을 한 결과 브로콜리의 sulforaphane 함량이 17.51 mg/100 g D.W으로 가장 높았음.
- 적양배추의 sulforaphane 함량이 13.56 mg/100 g D.W으로 브로콜리 다음으로 함량이 높았음.
- 십자화과 식물 중 브로콜리, 적양배추를 제외한 다른 식물(양배추, 콜리플라워, 순무, 무)의 경우 sulforaphane 함량이 1 mg/100 g D.W이하로 상당히 낮은 수준이었음.
- 십자화과 식물의 성체 중 브로콜리와 적양배추가 sulforaphane 함량이 가장 높게 확인 되었고, 추가 실험으로써 브로콜리, 적양배추의 성체, 어린잎, 종자 추출 건조물을 통해 sulforaphane과 glucoraphanin 함량을 분석하였음.

(3) 십자화과 식물인 브로콜리, 적양배추의 성체, 어린잎, 종자 추출 건조물을 통한 sulforaphane과 glucoraphanin 함량 분석

- 십자화과 식물 성체의 sulforaphane 함량 분석에서 가장 높은 함량을 확인하였던 브로콜리와 적양배추의 성체, 어린잎, 종자의 추출 건조물을 통한 sulforaphane과 glucoraphanin 함량을 분석하였음.
- 브로콜리와 적양배추의 성체는 Fig 44와 같이 위탁기관인 어랑진 영농조합법인에서 제공한 제주산 브로콜리와 적양배추를 분석에 사용하였음.
- 브로콜리와 적양배추의 어린잎은 Fig 44와 같은 종자를 미온수에 만나질 침지 후 솜이나 스펀지를 깔고 물에 침전시켜 일주일 동안 방치하여 싹틔움이 나오기를 기다렸으며, 싹틔움이 나온 후 약 2주간 영양분이 충분한 조건에서 재배를 실시하였음.

- 브로콜리와 적양배추의 종자는 Fig 44와 같이 브로콜리는 (주)사카타 코리아에서 구입한 SK3-085 제품을 사용하였으며, 적양배추는 농업회사법인 (주)제농에서 구입한 레드캡 양배추 제품을 사용하였음.
- 브로콜리, 적양배추의 성체, 어린잎, 종자의 추출건조물 제조는 Table 18과 같이 각각 무게를 측정한 후 물을 무게대비 2배수 첨가하여 40℃에서 2h 동안 myrosinase 효소에 의한 sulforaphane 전환을 유도하였으며, 식품용으로 사용 가능한 주정을 8배수 첨가하여 2h 동안 교반추출을 진행하였음. 추출 후 Whatman 여과지 No.2로 여과하여 상등액을 회수한 후 40℃ 이하 온도에서 감압농축을 10배 가량 진행 하였으며, 농축액을 동결건조 하여 브로콜리, 적양배추의 추출건조물을 제조하였음.
- 제조된 브로콜리, 적양배추 추출건조물은 50% methanol에 용해하여 UPLC-MS/MS를 통해 sulforaphane과 glucoraphanin 함량을 분석하였음.



Fig 44. 브로콜리, 적양배추 종자, 어린잎, 성체

Table 18. 십자화과 식물 성체, 어린잎, 종자의 무게 및 수분함량

| 구분 | 브로콜리 | | | 적양배추 | | |
|---------|--------|-------|------|--------|-------|------|
| | 성체 | 어린잎 | 종자 | 성체 | 어린잎 | 종자 |
| 무게(g) | 300.45 | 61.93 | 5.15 | 300.23 | 57.08 | 5.17 |
| 수분(%) | 85.50 | 92.57 | 3.63 | 92.02 | 94.08 | 4.37 |
| 건조중량(g) | 43.50 | 4.60 | 4.43 | 23.76 | 3.38 | 3.23 |

Table 19. 십자화과 식물(성체, 어린잎, 종자)의 sulforaphane과 glucoraphanin 함량분석

(단위 : mg/100g D.W)

| 구분 | 브로콜리 | | | 적양배추 | | |
|------------------|--------|-------|--------|-------|------|-------|
| | 성체 | 어린잎 | 종자 | 성체 | 어린잎 | 종자 |
| Sulforaphane 함량 | 80.87 | 13.50 | 303.26 | 30.86 | 7.68 | 99.03 |
| Glucoraphanin 함량 | 275.26 | 7.73 | 806.68 | 13.13 | 0.75 | 87.39 |

* D.W - Dry Weight

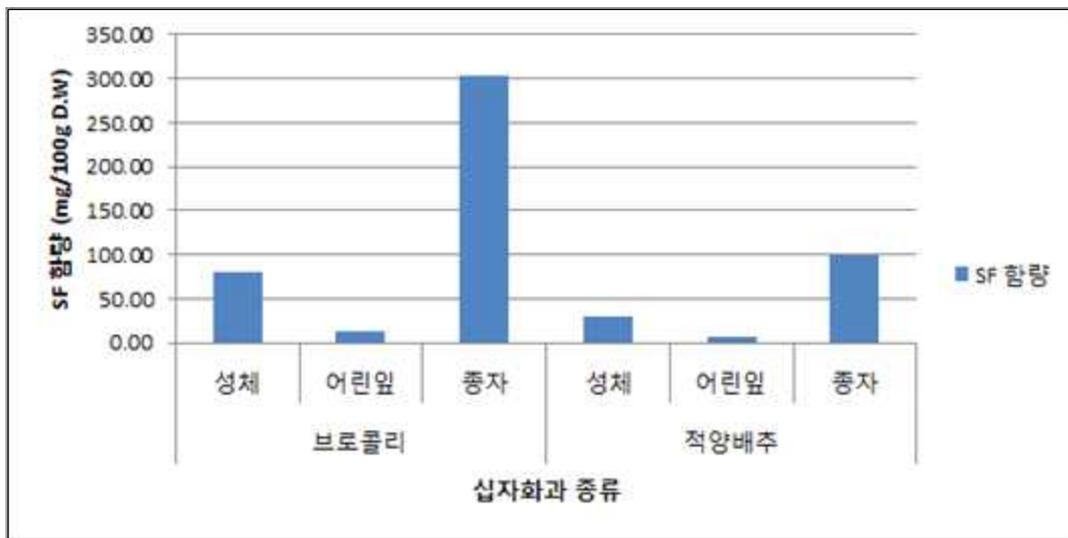


Fig 45. 브로콜리, 적양배추(성체, 어린잎, 종자)의 sulforaphane 함량분석

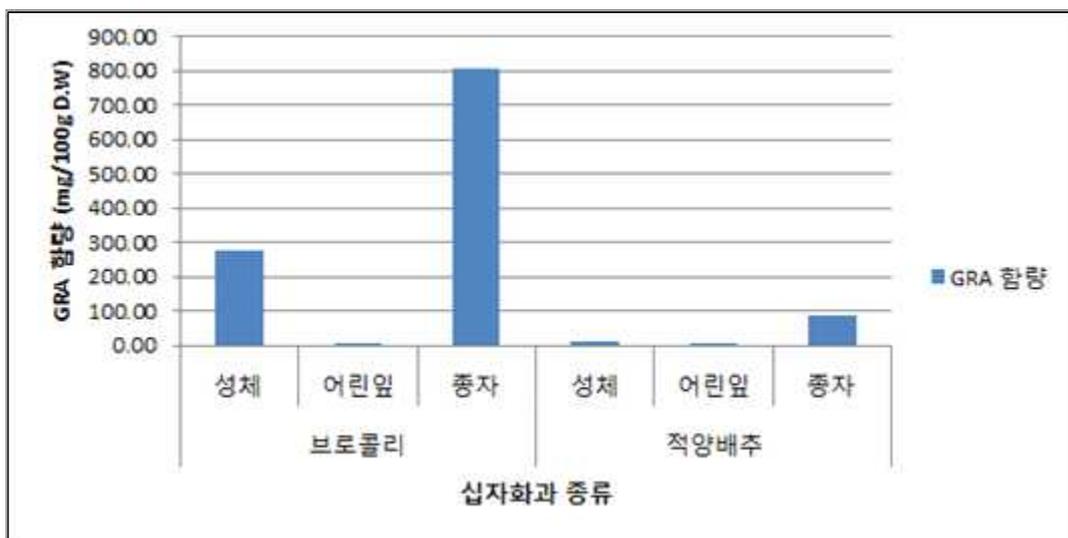


Fig 46. 브로콜리, 적양배추(성체, 어린잎, 종자)의 glucoraphanin 함량분석

- 십자화과 식물 두 가지 모두 종자 > 성체 > 어린잎 순으로 지표성분의 함량이 높았으며, 브로콜리와 적양배추중 브로콜리의 sulforaphane과 glucoraphanin 함량이 적양배추에 비해 성체, 어린잎, 종자에서 모두 함량이 높은 것을 확인하였음.
- 브로콜리, 적양배추(성체, 어린잎, 종자)의 sulforaphane과 glucoraphanin 함량을 분석한 결과 Table 19와 같이 브로콜리 종자에서 sulforaphane 함량 303.26 mg/100 g D.W, glucoraphanin 함량 806.68 mg/100 g D.W으로 가장 높았음.
- Sulforaphane과 glucoraphanin함량은 브로콜리 종자(SF-303, GRA-806), 브로콜리 성체(SF-80, GRA 275), 적양배추 종자(SF-99, GRA-87), 적양배추 성체(SF-30, GRA-13), 브로콜리 어린잎(SF-13, GRA-7), 적양배추 어린잎(SF-7, GRA-0.7) 순서로 높았음.
- 십자화과 식물(브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 방울양배추, 무, 순무)의 1차 sulforaphane 함량 평가결과 브로콜리와 적양배추가 가장 우수 하였으며, 브로콜리가 적양배추보다 우수하였음. 2차 평가인 브로콜리, 적양배추의 성체, 어린잎 종자 별 sulforaphane과 glucoraphanin의 함량을 비교한 결과 적양배추보다 브로콜리가 성체, 어린잎, 종자 모두에서 우수하였음.
- 십자화과 식물의 기능성 성분함량 비교결과 브로콜리가 가장 우수하여 최종선별 하였으며, 2차년도부터는 브로콜리 시료를 대상으로 실험 하고자 함.

2. 산업화를 위한 최적 sulforaphane 증폭과 면역증강 활성을 가지는 십자화과 식물 원료의 선정

가. 항암 활성과 sulforaphane 함량 비교를 통한 십자화과 식물 원료의 선정

(1) 십자화과 식물의 sulforaphane 함량 비교

- 재현성 있는 십자화과 식물 품종간의 sulforaphane 함량의 비교를 위해 십자화과 식물인 브로콜리, 적양배추, 양배추, 순무, 무, 콜리플라워와 추가로 방울양배추, 콜라비, 케일을 추가로 분석하였음.
- 십자화과 식물의 분석은 UPLC-MS/MS 장비를 활용하여 sulforaphane 분석을 실시하였음.
- 십자화과 식물의 성체는 위탁기관인 어랑진에서 브로콜리, 적양배추, 양배추, 무, 순무, 방울양배추를 제공해 주었으며, 제주지역 마트에서 콜리플라워, 콜라비, 케일을 구매하여 연구에 사용하였음.

- 십자화과 성체는 100 g씩 다듬어서 믹서기로 갈은 후 200 mL을 첨가하여 40℃에서 2h 동안 myrosinase에 의한 sulforaphane 전환을 유도하였으며, methanol 300 mL을 추가하여 1차 추출을 진행하였고, methanol 800 mL로 2차 추출, 3차 추출을 진행하여 십자화과 성체 추출물을 제조하고 상등액을 0.2 µm filter로 여과한 후 희석하여 UPLC-MS/MS로 sulforaphane을 분석하였음.

Table 20. 십자화과 식물 성체의 sulforaphane 함량분석

단위 : mg/100g D.W

| | 브로콜리 | 적양배추 | 방울양배추 | 콜라비 | 양배추 | 순무 | 무 | 컬리플라워 | 케일 |
|------------------------|-------|-------|-------|------|------|------|------|-------|------|
| Sulforaphane 함량 | 30.88 | 17.25 | 5.24 | 2.19 | 0.80 | 0.64 | 0.52 | 0.23 | 0.17 |

*D.W : Dry Weight

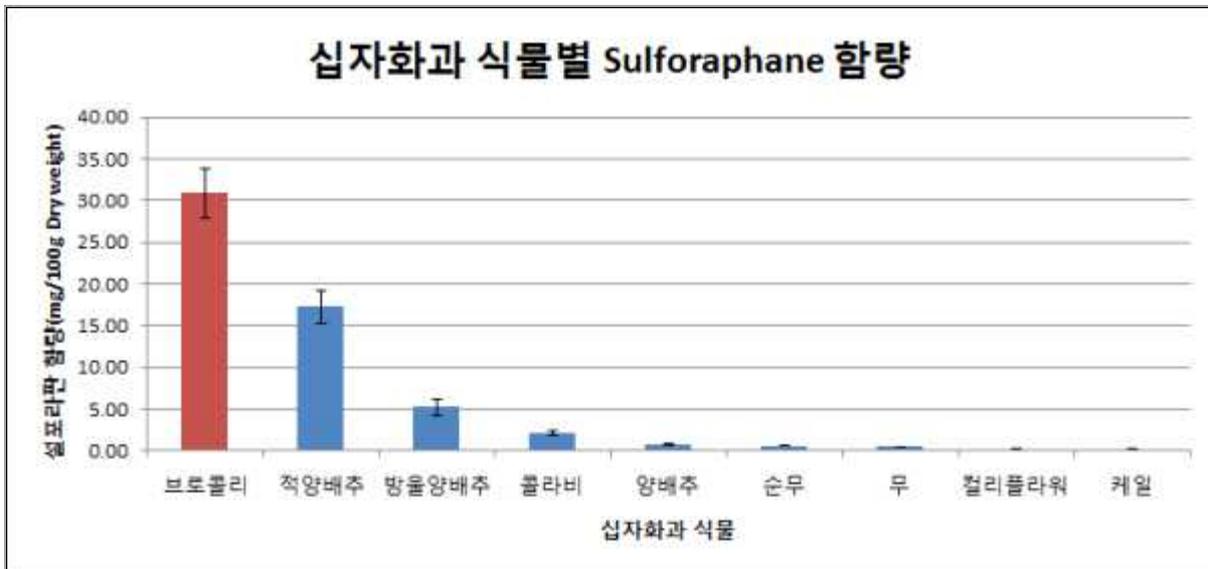


Fig 47. 십자화과 식물 성체의 sulforaphane 함량분석

- 십자화과 식물 성체의 sulforaphane 함량분석을 한 결과 브로콜리, 적양배추 순으로 각각 30.88, 17.25 mg/100g D.W을 함유하였다.
- 십자화과 식물 중 방울양배추는 5.24 mg/100 g D.W, 콜라비는 2.19 mg/100 g D.W, 그 외 식물인 양배추, 순무, 무, 컬리플라워, 케일의 경우 sulforaphane 함량이 1 mg/100g D.W이하로 상당히 낮은 수준이었음.
- 기존 분석결과와 동일하게 sulforaphane 함량이 가장 우수한 것은 브로콜리임.

(2) 십자화과 식물의 항암활성 비교

- 십자화과 식물의 항암활성 평가는 십자화과 식물 중 sulforaphane 함량이 우수한 브로콜리, 적양배추, 방울양배추 그리고 가공성이 우수한 무를 알콜 추출 건조하여 협동기관인 경기대학교에서 항암활성을 비교하였음.
- 항암활성을 비교 시 사용된 mouse 및 human 유래 종양세포는 최근 국내 암환자의 사망 원인 비율이 가장 높은 폐암 세포주(B16BL6, A549, NCI-H460)와 대장암 세포주(Colon26-M3.1, HT29, SW620)가 사용되었음.
- 폐암유래 세포주(B16BL6, A549, NCI-H460)에서는 브로콜리 추출물이 B16BL6 - 10,000 ppm 농도에서 50% 사멸유도, A549 - 10,000 ppm 농도에서 40% 사멸유도, NCI-H460 - 10,000 ppm 농도에서 80% 사멸유도로 가장 우수한 항암활성을 나타냈음.
- 대장암유래 세포주(Colon26-M3.1, HT29, SW620)에서도 브로콜리 추출물이 HT29 - 100 ppm 농도부터 사멸유도, SW620 - 200 ppm 농도부터 사멸유도로써 가장 우수한 항암활성을 나타냈음.
- 브로콜리 다음으로 sulforaphane 함량이 우수한 적양배추의 경우 항암활성을 보이지 않았음.
- Sulforaphane 함량이 가장 높았던 브로콜리가 가장 우수한 항암활성을 나타내었으며, 적양배추의 경우 브로콜리 다음으로 sulforaphane 함량이 우수하였지만 항암활성을 보이지 않았음.

나. 산업화를 위한 십자화과 식물의 경제성 분석 및 원료의 선정

(1) 십자화과 식물(브로콜리, 적양배추)의 성체와 새싹의 재배현황

- 브로콜리의 전국 생산량은 2012년도에 21,871 M/T 이며, 제주도에서 생산된 양은 17,490 M/T으로 80%이상이 제주도에서 생산되었음.

Table 21. 브로콜리 재배면적 및 생산량

| 구분 | | 단위 : ha, % | | | |
|--------------|---------|------------|-------|--------|--------|
| | | 2000 | 2002 | 2006 | 2012 |
| 재배면적 (ha) | 전국 | 28 | 150 | 1,762 | 1,545 |
| | 제주 | 13 | 94 | 1,285 | 1,314 |
| | 전국대비(%) | 46 | 63 | 73 | 85 |
| 생산량 (M/T) | 전국 | 778 | 3,075 | 40,065 | 21,871 |
| | 제주 | 409 | 1,770 | 25,682 | 17,490 |
| | 전국대비(%) | 51 | 58 | 64 | 80 |

* 자료 : 2012 채소류생산실적, 농림부

- 적양배추의 2002년도 전국 재배면적은 204 ha 이며, 제주도의 재배면적은 86 ha로 42%의 비중을 차지함.
- 2002년도 전국 생산량은 5,873 M/T이며, 제주도에서 생산된 양은 2,819 M/T으로 48% 이상이 제주도에서 생산되었음.

Table 22. 적양배추 재배면적 및 생산량

| 구분 | | 단위 : ha | | | |
|----------|----|---------|-------|------|------|
| | | 1998 | 2002 | 2003 | 2005 |
| 재배면적(ha) | 전국 | 124 | 204 | 273 | 285 |
| 생산량(M/T) | 전국 | 3,744 | 5,873 | | |

* 자료 : 2002. 농림부

- 새싹채소의 2005년도 재배면적은 전체 65 ha이며, 브로콜리 새싹이 0.7 ha, 기타(적채 등)가 2.1 ha로 브로콜리와 기타(적양배추 외)의 재배비중은 각각 1.1%, 3.2% 수준으로 미비한 수준임.

Table 23. 새싹채소 재배면적 및 생산량

| 구분 | | 단위 : ha, % | | | | |
|------|------------|------------|------|------|------|----------|
| | | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 비중(2005) |
| 재배면적 | 전체 | 34 | 44 | 51 | 65 | 100 |
| | 브로콜리 새싹 | 0.4 | 0.5 | 0.5 | 0.7 | 1.1 |
| | 기타(적양배추 외) | 1.1 | 1.4 | 1.6 | 2.1 | 3.2 |

* 자료 : 한국농촌경제연구원

* 기타 : 적양배추, 보리, 레드비트, 크래스, 해바라기, 적무 등

- 십자화과 식물(브로콜리, 적양배추)의 성체와 새싹의 재배현황을 비교하였을 때 성체의 재배면적 및 생산량에 비해 새싹의 재배면적과 생산량은 1%이하로 미비한 수준으로 원활한 양의 원료를 공급받기에 어려운 구조로 새싹이 아닌 성체를 활용하는 것으로 선정하였음.
- 브로콜리의 2006년도 재배면적은 1,762 ha, 적양배추의 2005년도 재배면적은 285ha로써 브로콜리의 재배면적이 1,477 ha 더 많음.
- 2002년도 전국 재배 양 대비 제주도의 재배비율은 브로콜리 63%, 적양배추 48%로 브로콜리의 재배비율이 많았으며, 2012년도의 경우 브로콜리의 재배의 80%이상이 제주도에서 생산되었음.
- 산업화를 위한 십자화과 식물의 선정의 조건으로 지표성분인 sulforaphane의 함량비교, 항암활성 비교, 재배현황비교의 결과로써 브로콜리를 선정하였음.

3. Sulforaphane의 최대 증폭을 위한 최적의 PEF처리 조건 선정

가. PEF 처리조건 별 브로콜리의 Sulforaphane 함량분석

- PEF 최적처리 조건을 확립하기 위하여 위탁기관인 어랑진 으로부터 제공받은 브로콜리를 5 kw 규격의 pilot PEF 장비를 이용하여 여러 가지 처리 조건별로 slforaphane 함량을 분석하였음.



Fig 48. 5kw PEF 펄스 자기장 발생기

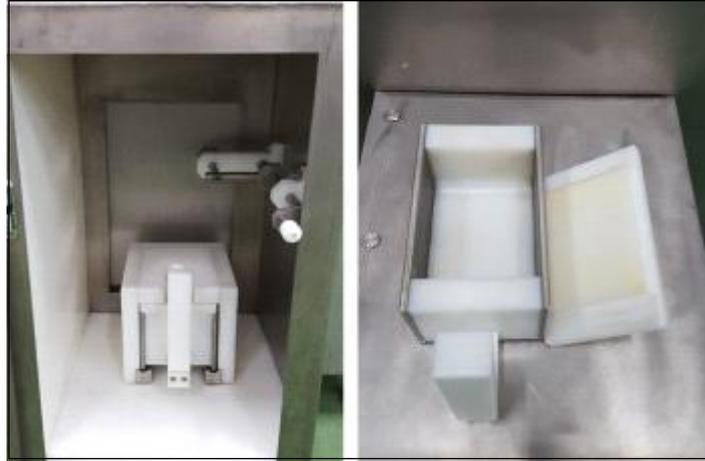


Fig 49. PEF Batch 처리장치(Batch Chamber)

○ 브로콜리의 PEF 처리는 가식부 부분만 세절한 브로콜리를 Total Energy기준으로 control (Non-PEF), 5 kJ, 10 kJ, 20 kJ, 30 kJ 5가지 처리 군으로 실험하였음.

Table 24. 브로콜리의 PEF 처리조건

| | Out Voltage (%) | Frequency (Hz) | Pulse width (us) | 전기장 세기 (kv/cm) | Pulse Number | Total Energy (kJ) |
|---------|-----------------|----------------|------------------|----------------|--------------|-------------------|
| Control | Non-PEF | | | | | 0 |
| PEF-5 | 55 | 100 | 20 | 2.1 | 700 | 5 |
| PEF-10 | 55 | 100 | 20 | 2.1 | 1500 | 10 |
| PEF-20 | 55 | 200 | 20 | 2.1 | 2700 | 20 |
| PEF-30 | 55 | 200 | 20 | 2.1 | 3900 | 30 |

○ 브로콜리의 PEF 조건별 처리 후 가식부 20 g에 물 100 mL(5배수)를 첨가하여 40℃ 조건에서 myrosinase에 의한 생물전환 반응을 2h 동안 진행 하였으며, 생물전환 후 methanol 300 mL를 첨가하여 3 h 동안 교반 추출을 진행하였음.

○ 추출 후 상등액은 회수하여 50% methanol로 50배 희석하여 0.2 μm syringe filter를 하여 UPLC-MS/MS로 분석을 진행하였음.

Table 25. PEF 처리조건에 따른 브로콜리의 SF 함량

(단위 : mg/100g D.W)

| | Control | PEF-5 | PEF-10 | PEF-20 | PEF-30 |
|-----------------|---------|-------|--------|--------|--------|
| Sulforaphane 함량 | 27.31 | 25.03 | 36.68 | 29.54 | 32.33 |

* D.W : Dry Weight

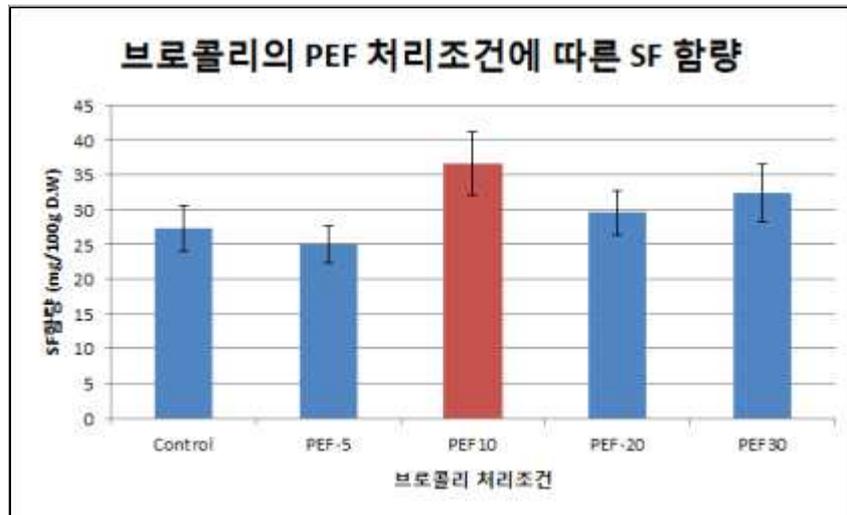


Fig 50. 브로콜리의 PEF 처리조건에 따른 sulforaphane 함량

- 브로콜리의 PEF처리 조건에 따른 SF함량을 분석한 결과 PEF 처리를 하지 않은 control의 경우 27.31 mg/100 g D.W의 함량이 분석되었고, PEF 처리군인 PEF-5, PEF-10, PEF-20, PEF-30의 경우 각각 25.03, 36.68, 29.54, 32.33 mg/100 g D.W이 분석되었음.
- 5kw pilot PEF장비를 이용한 PEF 조건별 실험의 경우 PEF-10(10 kJ, Total Energy) 조건의 경우가 36.68 mg/100 g D.W으로 가장 높은 함량 이었으며, 최적조건으로 선정하였음.
- Total energy가 높았던 20 kJ, 30 kJ의 경우에는 오히려 10 kJ보다 SF함량이 각각 7.14, 4.35 mg/100 g D.W이 낮은 것으로 분석되었음.

나. 브로콜리의 물리처리 방법에 따른 sulforaphane 함량분석

- PEF 최적처리조건(10 kJ, total energy)에서의 브로콜리의 sulforaphane 함량의 증폭정도를 비교하기 위하여 브로콜리의 처리 방법(생 것, 데친 것, 간 것, PEF)에 따른 sulforaphane 함량을 분석하였음.
- 물리처리 방법에 따른 sulforaphane 함량분석에 사용된 브로콜리는 제주산으로 위탁기관인 어랑진으로부터 제공받았음.



Fig 51. 제주산 브로콜리

- 브로콜리의 물리처리 방법에 따른 Sulforaphane 함량분석은 물리처리 방법별로 10회 반복처리를 하여 분석한 결과를 SPSS.PASW18 통계 프로그램을 통해 평균, 평균의 95% 신뢰구간(하한~상한), 표준오차를 산출하여 비교하였음.
- 브로콜리의 물리처리 방법 중 대조군(control)인 생것은 다듬은 브로콜리 100 g에 물 500 mL을 첨가한 후 40℃ 조건에서 2 h 동안 효소반응을 유도 하였으며, 반응 후 methanol 1,500 mL을 추가로 첨가하여 믹서로 균질하게 갈아 3 h 동안 교반추출을 하였음.
- 물리처리 방법 중 갈은 것은 다듬은 브로콜리 100 g에 물 500 mL을 첨가하여 믹서로 균질하게 갈아 40℃ 조건으로 2 h 동안 효소반응을 유도 하였으며, 반응 후 methanol 1,500 mL을 추가로 첨가하여 믹서로 균질하게 갈아 3 h 동안 교반추출을 하였음.
- 물리처리 방법 중 데친 것은 다듬은 브로콜리 100 g을 100℃ 조건에서 1 min 동안 데치는 과정을 거친 후 물 500 mL에 침지하여 40℃ 조건에서 2 h 동안 효소반응을 유도 하였으며, 반응 후 methanol 1,500 mL을 추가로 첨가하여 믹서로 균질하게 갈아 3 h 동안 교반추출을 하였음.
- 물리처리 방법 중 PEF 처리군은 5 kw Pilot PEF Batch Chamber 장비를 이용하여 다듬은 브로콜리 100 g을 최적 처리 조건인 total energy 10 kJ (out voltage : 55%, frequency : 100 Hz, pulse width : 20 μ s, 전기장 세기 : 2.1 kv/cm, pulse number : 1,500)로 처리 하였으며, PEF 처리 후 원물은 물기를 제거한 후 물500 mL에 침지하여 40℃ 조건에서 2 h 동안 효소반응은 유도 하였으며, 반응 후 methanol 1,500 mL을 추가로 첨가하여 믹서로 균질하게 갈아 3 h 동안 교반추출을 하였음.
- 추출 후 상등액은 회수하여 50% methanol로 10배 희석하여 0.2 μ m syringe filter를 하여 UPLC-MS/MS로 분석을 진행하였음.

Table 26. PEF 처리조건

| 구분 | Out voltage (%) | Frequency (Hz) | Pulse width (us) | 전기장세기 (kv/cm) | Pulse number | Total energy (kJ) |
|--------|-----------------|----------------|------------------|---------------|--------------|-------------------|
| PEF 처리 | 55 | 100 | 20 | 2.1 | 1500 | 10 |

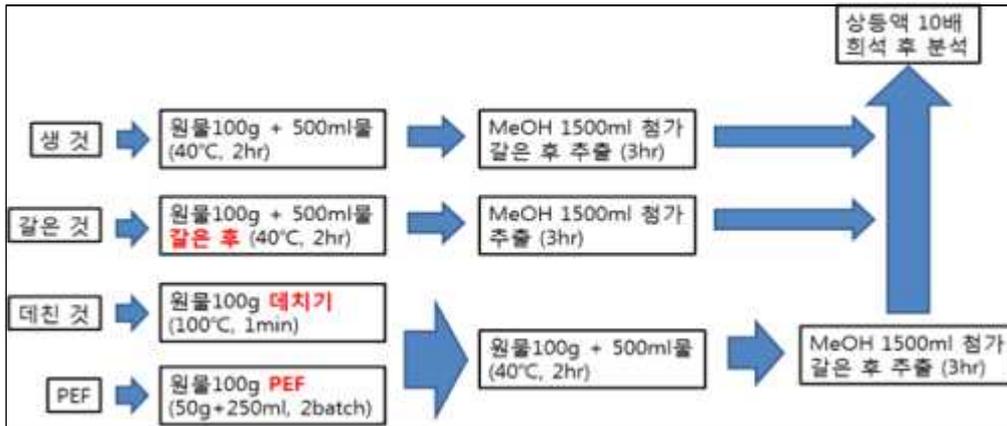


Fig 52. 브로콜리의 물리처리 방법

Table 27. 브로콜리의 물리처리 방법에 따른 sulforaphane 함량분석

(단위 : mg/100g D.W)

| 구분 | 생것(Control) | 데친것 | 간것 | PEF처리 (10kJ) |
|--------------|-------------|-------|-------|--------------|
| 평균 | 30.81 | 1.91 | 45.56 | 49.43 |
| 평균의 95% 신뢰구간 | 하한 | 1.53 | 28.89 | 39.59 |
| | 상한 | 39.14 | 62.22 | 59.27 |
| 표준오차 | 3.40 | 0.16 | 6.81 | 4.02 |

*D.W : Dry Weight

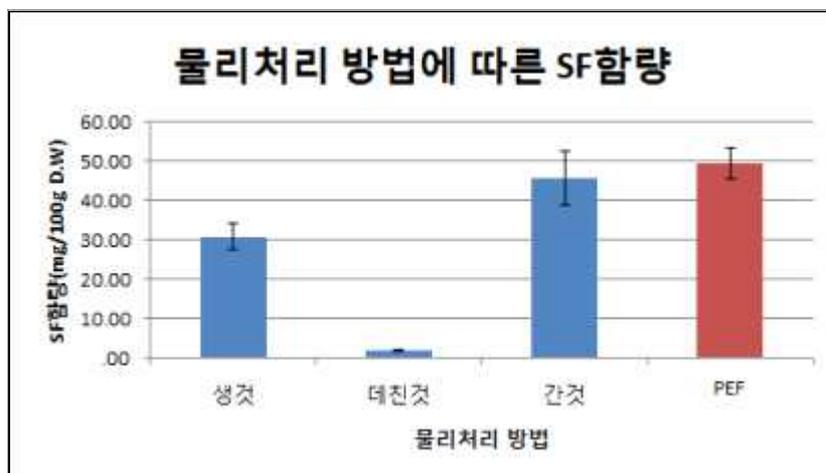


Fig 53. 브로콜리의 물리처리 방법에 따른 sulforaphane 함량비교

- 브로콜리의 물리처리 방법에 따른 sulforaphane 함량을 분석한 결과 생것(Control) 30.81 mg/100 g D.W, 데친 것 1.91 mg/100 g D.W, 간 것 45.56 mg/100 g D.W, PEF 49.43 mg/100 g D.W으로 분석되었음.
- 물리처리 방법 중 가장 sulforaphane 함량이 우수한 처리방법은 PEF 처리로써 생것(Control)과 비교 하였을 때 1.6배 이상 증가가 되었으며, 같은 것과 비교하였을 때 1.1배 이상 증가 되었고, 특히 데친 브로콜리와 비교하였을 때는 25.9배 이상 증폭되었음.
- 물리처리 방법 중 데친 것의 sulforaphane 함량을 분석하였을 때 기능성분인 sulforaphane이 열에 의한 손실이 크다는 것을 확인 하였음.
- PEF 처리의 경우 다른 물리처리방법에 비해 기능성분인 sulforaphane 함량은 가장 높게 증폭 되었으며, 같은 것과는 다르게 원물상태 그대로를 유지할 수 있다는 장점이 있었음.
- 추가로 물리처리(생것, 데친 것, PEF처리)에 따른 물성을 비교해 보았음.

다. 브로콜리의 물리처리 방법에 따른 물성비교

- 브로콜리의 물리처리 방법에 따른 물성비교를 위하여 Texture Analyzer (T.A)와 TA9 Needle (1.0 mm D, 43 mm L)을 활용하여 물성을 평가하였다.
- 브로콜리의 물리처리 방법은 생것, 데친 것, PEF처리한 것으로 수세한 원물을 각각 생 것 (Control) : 비 처리군, 데친 것 : 100℃, 1 min 처리, PEF 처리 : total energy 10 kJ 처리한 후 T.A를 측정하기 적당한 부위를 다듬어서 지름 1 cm Cork Borer를 활용하여 T.A 측정용 샘플을 만들어 관통 시 필요한 Load (g)값을 측정하였음.



Fig 54. T.A 측정을 위한 전처리(지름 1 cm Cork Borer 관통) 및 T.A 측정(needle : 1.0 mm D, 43 mm L)

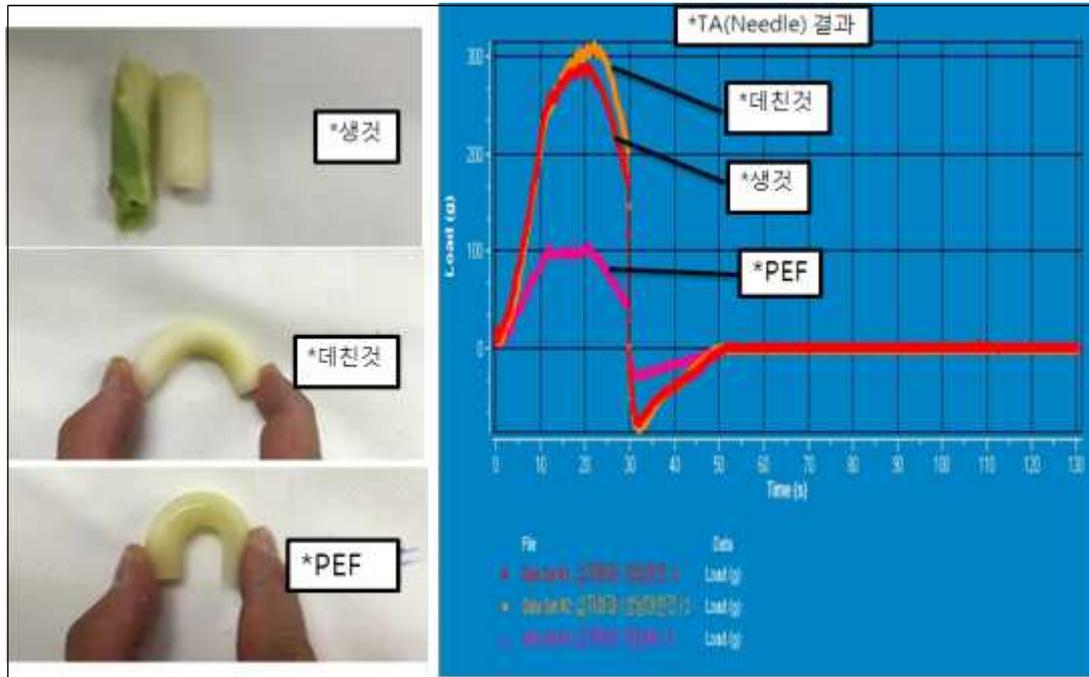


Fig 55. 브로콜리의 물리처리 방법에 따른 texture analyzer 측정결과

Table 28. TA9 Needle을 이용한 브로콜리의 물리처리 방법에 따른 T.A측정 결과

(단위 : g)

| 구분 | 생 것 | 데친 것 | PEF 처리 |
|----------|-------|-------|--------|
| Max Load | 286.5 | 292.5 | 108 |

- 브로콜리의 물리처리 방법에 따른 물성변화를 T.A로 측정한 결과 데친 것(292.5 g) > 생것(286.5 g) > PEF처리(108 g) 순서로써 생 것과 데친 것에 비해 PEF 처리한 브로콜리가 관통할 때 필요한 힘의 양이 적은 것으로 확인하였음.
- PEF 처리한 브로콜리는 생 것, 데친 것에 비해 약 2.6배 정도 관통하는데 필요한 힘이 적었으며, PEF 처리를 통해 브로콜리의 조직이 연해지는 것을 확인하였음.

라. ESP (Epithiospecifer protein) 저해공정을 통한 브로콜리의 sulforaphane 함량분석

(1) ESP에 의한 glucoraphanin의 생물전환

- ESP (Epithiospecifer protein)는 십자화과 식물에 존재하는 황과 결합하는 특이적인 단백질임.
- 신선한 십자화과 식물에는 sulforaphane의 전구체인 glucoraphanin의 함량이 높고 항암활성 성분인 sulforaphane의 함량은 상대적으로 매우 낮음. 그러나 신선한 십자화과 식물을 분쇄하여 세포

벽이 파괴되면 myrosinase에 의해 glucoraphanin이 sulforaphane으로 생물 전환됨으로써 항암활성을 나타냄.

- 전구체인 glucoraphanin은 myrosinase 효소에 의해 β-D-glucose가 가수분해 되어 sulforaphane으로 전환되게 됨. 이때 sulforaphane에 노출된 황이 ESP와 결합하게 되면, 항암활성을 나타내는 sulforaphane으로 전환되지 않고 sulforaphane nitrile로 전환되어 항암활성을 잃게 됨.

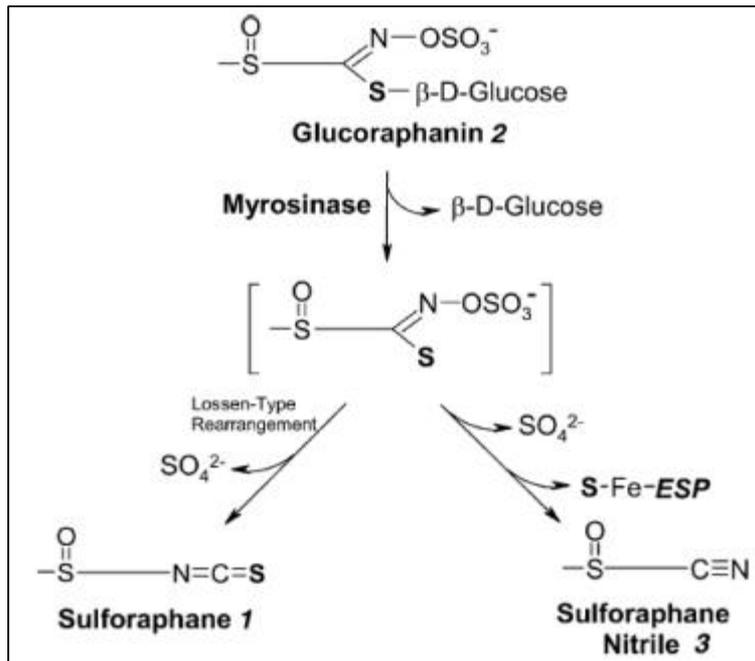


Fig 56. myrosinase효소 활성에 의한 glucoraphanin의 생물전환(Phytochemistry, 65:1273-1281, 2004)

(2) ESP 저해공정에 의한 브로콜리 sulforaphane 함량분석

- Sulforaphane 생물전환의 저해작용을 하는 ESP 단백질의 경우 50도 이상부터 변성에 의한 활성이 감소됨.
- Myrosinase 효소의 경우 60℃ 이상부터 변성에 의한 활성이 감소함.
- Sulforaphane 생물전환을 위해서는 myrosinase의 활성이 필요하기 때문에 ESP활성만을 저해 할 수 있는 50~60℃ 조건에서 7 min 동안 스팀으로 찌 후 myrosinase 최적 활성 조건인 40℃로 냉각하여 sulforaphane 생물전환을 유도하였음.

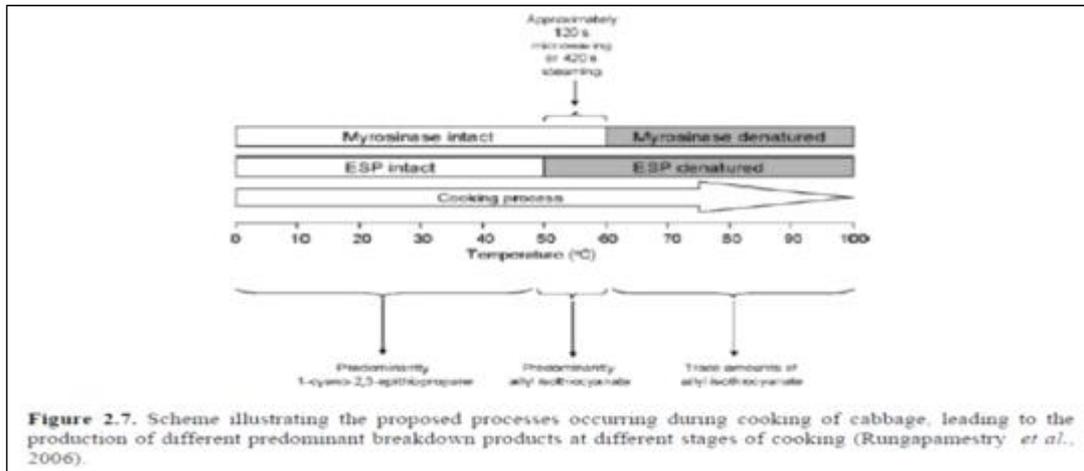


Fig 57. 온도 조건에 따른 ESP와 myrosinase 활성(Instituto Superior de Agronomia Universidade Tecnica de Lisboa, 2010)

- 브로콜리 원물의 ESP저해 공정에 의한 분석을 하기 위하여 지표성분인 sulforaphane의 함량분석을 하였음.
- ESP 저해공정을 진행한 처리군의 경우 같은 브로콜리 20 g에 물 100 mL (5배수)을 첨가하여 ESP저해 조건인 60°C에서 7 min 동안 고압멸균살균을 진행 하였으며, 저해공정 후 40°C로 냉각하여 2 h 동안 glucoraphanin성분이 sulforaphane으로 전환되도록 효소반응을 유도 하였으며, 반응 완료 후 methanol 300 mL(15배수) 첨가하여 3 h 동안 교반추출을 진행하였음.
- 추출 후 상등액은 회수하여 50% methanol로 50배 희석하여 0.2 μm syringe filter를 하여 UPLC-MS/MS로 분석을 진행하였음.
- ESP 저해공정을 진행하지 않은 대조군(Control)의 경우 같은 브로콜리 20 g에 물 100 mL(5배수)을 첨가하여 40°C 조건으로 2 h 동안 glucoraphanin 성분이 sulforaphane으로 전환 되도록 효소반응을 유도한 후 ESP 저해공정 처리 군과 동일하게 진행하였음.

Table 29. 추출 전 브로콜리 무게 및 수분함량

| 구분 | ESP 처리군-1 | ESP 처리군-2 | ESP 처리군-3 | 대조군-1 (Control) | 대조군-2 (Control) | 대조군-3 (Control) |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 성체무게(g) | 50.44 | 50.8 | 50.59 | 50.27 | 50.38 | 50.29 |
| 수분(%) | 90.48 | 90.48 | 90.48 | 90.48 | 90.48 | 90.48 |
| 건조중량(g) | 4.80 | 4.84 | 4.82 | 4.79 | 4.80 | 4.79 |

Table 30. ESP 처리공정에 의한 브로콜리의 SF 함량분석

| (단위 : mg/100g D.W) | | |
|--------------------|---------|--------------|
| Sulforaphane 함량 | ESP 처리군 | 대조군(Control) |
| 1 | 6.75 | 3.74 |
| 2 | 5.45 | 4.32 |
| 3 | 6.56 | 4.12 |
| 평균 | 6.25 | 4.06 |
| 표준편차 | 0.70 | 0.30 |

*D.W : Dry Weight

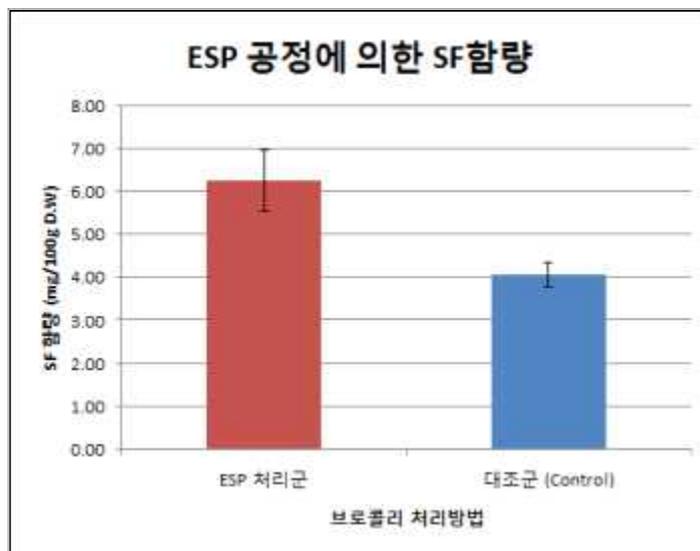


Fig 58. ESP 저해공정에 의한 브로콜리의 sulforaphane 함량분석

- ESP 저해 공정에 의한 브로콜리의 sulforaphane 함량분석을 한 대조군의 함량이 4.06 mg/100 g D.W인 반면 ESP 저해공정 처리를 진행한 브로콜리의 sulforaphane 함량은 6.25 mg/100 g D.W으로 함량이 상승하였음.
- ESP 처리군의 경우가 대조군에 비해 기능성분인 sulforaphane함량이 1.5배 더 상승하였음.
- ESP 저해공정을 통해 전구체인 glucoraphanin 성분이 sulforaphane으로 생물전환 되도록 유도되었음을 확인하였음.
- ESP 저해공정을 통해 sulforaphane함량이 증폭됨을 확인하였으며, ESP 저해공정과 PEF 처리공정 병합을 통한 sulforaphane함량을 비교분석 하기 위한 실험을 추가로 진행하였음.

마. 최적 sulforaphane 증폭조건에 의한 브로콜리의 sulforaphane 함량분석

- 브로콜리의 최적 sulforaphane 증폭조건을 확립을 위해 ESP 저해공정과 PEF 처리공정의 병합을 통한 sulforaphane 함량을 비교분석 하였음.
- 각각의 처리공정은 3반복 진행하여 분석한 결과를 비교분석 하였음.
- 브로콜리 처리는 아무처리를 하지 않은 대조군(Control)과 ESP 저해공정만을 실시한 ESP 처리군, PEF 공정만 실시한 PEF 처리군 그리고 ESP 저해공정과 PEF 처리공정을 병합하여 실시한 ESP-PEF 처리군으로 나누어 실험을 실시하였음.
- 대조군(Control)의 경우 다듬은 브로콜리 20 g에 물 100 mL (5배수)을 첨가하여 40°C 조건으로 2 min 동안 glucoraphanin 성분이 sulforaphane으로 전환 되도록 효소반응을 유도한 후 methanol 300 mL (15배수)를 추가로 첨가하여 믹서로 갈아 균질화 하여 3 h 동안 교반 추출을 진행하였음.
- ESP 처리군의 경우 다듬은 브로콜리 20 g에 물 100 mL (5배수)을 첨가하여 ESP 저해 조건인 60°C에서 7 min 동안 고압증기멸균을 진행 하였으며, 저해공정 후 40°C로 냉각하여 2 h 동안 glucoraphanin 성분이 sulforaphane으로 전환되도록 효소반응을 유도 하였으며, 반응 완료 후 methanol 300 mL (15배수)를 추가로 첨가하여 믹서로 갈아 균질화하여 3 h 동안 교반 추출을 진행하였음.
- PEF 처리군의 경우 다듬은 브로콜리를 5 kw pilot PEF batch chamber를 이용하여 최적 처리조건이 total energy 10 kJ로 처리하고 물 100 mL (5배수)을 첨가하여 40°C 조건으로 2 h 동안 glucoraphanin 성분이 sulforaphane으로 전환 되도록 효소반응을 유도한 후 methanol 300 mL (15배수)를 추가로 첨가하여 믹서로 갈아 균질화하여 3 h 동안 교반 추출을 진행하였음.
- ESP-PEF 처리군의 경우 다듬은 브로콜리를 ESP저해 조건인 60°C에서 7 min 동안 고압증기멸균을 진행 하였으며, 저해공정 후 5 kw pilot PEF batch chamber를 이용하여 최적 처리조건인 total energy 10 kJ로 처리하고 물 100 mL (5배수)을 첨가하여 40°C 조건으로 2 h 동안 glucoraphanin 성분이 sulforaphane으로 전환 되도록 효소반응을 유도한 후 methanol 300 mL (15배수)를 추가로 첨가하여 믹서로 갈아 균질화 하여 3 h 동안 교반 추출을 진행하였음.
- 추출 후 상등액은 회수하여 50% methanol로 50배 희석하여 0.2 µm syringe filter를 하여 UPLC-MS/MS로 분석을 진행 하였음.

Table 31. 브로콜리의 처리공정에 따른 sulforaphane 함량

(단위 : mg/100g D.W)

| 구분 | 대조군(Control) | ESP 처리군 | PEF 처리군 | ESP-PEF 처리군 |
|-----------------|--------------|---------|---------|-------------|
| Sulforaphane 함량 | 4.26 | 6.54 | 7.43 | 14.57 |

*D.W : Dry Weight

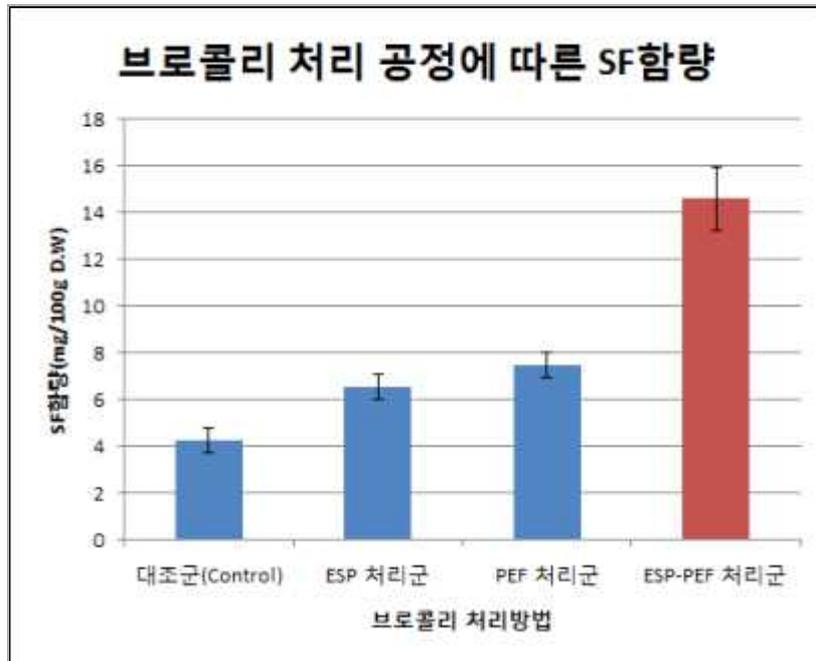


Fig 59. 브로콜리 처리공정에 따른 sulforaphane 함량 비교

- 브로콜리의 처리공정에 따른 비교 분석결과 대조군(Control) 4.26 mg/100 g D.W, ESP 처리군 6.54 mg/100 g D.W, PEF 처리군 7.43 mg/100 g D.W, ESP-PEF 처리군 14.57 mg/100 g D.W로 분석되었음.
- Sulforaphane 증폭공정을 하지 않은 대조군(Control)의 경우가 가장 낮은 sulforaphane 함량 보였으며, ESP-PEF 처리군 > PEF > ESP 처리군 순으로 sulforaphane 함량이 많았음.
- ESP 처리군은 대조군(Control)의 비해 sulforaphane 함량이 1.5배 이상 증폭되었음.
- PEF 처리군은 대조군(Control)의 비해 sulforaphane 함량이 1.7배 이상 증폭되었음.
- Sulforaphane 증폭공정인 ESP 저해공정과 PEF 처리공정 중 PEF 처리공정이 14% 이상 증폭의 효과가 더 우수 하였음.
- ESP-PES 처리군은 대조군(Control)의 비해 sulforaphane 함량이 3.4배 이상 증폭되었으며, ESP

처리군에 비해 2.2배 이상, PEF 처리군에 비해 1.9배 이상 sulforaphane 함량이 증폭된 것을 확인하였음.

- ESP 저해처리 공정과 PEF 처리공정 모두 sulforaphane 증폭을 유도하였으며, 특히 ESP 저해공정과 PEF 처리공정을 병합하였을 때는 각각을 따로 처리했을 때 보다 sulforaphane 함량의 증폭을 유도하였음.

4. PEF처리 공정 연속 공정 디자인과 공정별 변수 최적화(처리시간, 수분 조절 등) 및 scale up

가. 산업화를 위한 생산용 30 kw PEF의 최적공정 확립

(1) 생산용 30 kw PEF 개요

- 산업화를 위한 PEF 연속공정 확립을 30 kw PEF를 활용하였음.
- 브로콜리의 연속처리 공정을 위한 설비인 30 kw PEF의 구성은 pulse 자기장을 발생시키는 장치인 ELCRACK HVP 30 type의 PEF 발생기와 고체를 연속식으로 운반하기 위한 TB-320SF type의 treatment bath 두 가지로 구성되어 있음.



Fig 60. 생산용 30 kw 고체 연속처리 PEF 기기구성

- Pulse 자기장을 발생하는 HVP 30의 경우 높이 1,600 mm, 가로 1,475 mm, 너비 1,100 mm, 총 중량 1,200 kg으로 전원 전압 400 V, 정격 전류 100 A, 본선 주파수 50 Hz, 연결 타입

3-PHASES로 구성되어 있다.

- 고전압 발전기가 저전압 스위치로 사용되며 이는 전기 스위치에 의해 저전압(0 ~ 1,500 V)에서 펄스가 생성된다는 것을 의미하며, 변압기가 고전압의 펄스(30 kw)를 생성함.



Fig 61. PEF 발생기 HVP 30 Type

- PEF를 처리하기 위해 브로콜리를 운반하는 TB-320SF의 경우 높이 2,400 mm, 너비 1,360 mm, 총 길이 5,320 mm, 중량 1,500 kg 이며, 컨베이어 벨트 출력(output) 3 kw로 시간당 800 ~ 2,300 kg/h 처리를 할 수 있음.



Fig 62. Treatment bath (TB-320SF Type)

- Treatment Bath TB-320은 high voltage 제너레이터와 연결되었을 때만 사용이 가능하며, 제너레이터는 고압전류 Pulsed Electric Field (PEF, HVP 30)를 발생시켜 treatment bath에 있는 treatment 전극으로 펄스장을 전송함.
- 브로콜리는 treatment 전극 아래를 지나게 되어 고전압 pulse electric fields 처리를 받게 되며, 그 후 브로콜리는 treatment 사출구로 나와 추가적인 가공을 받게됨.

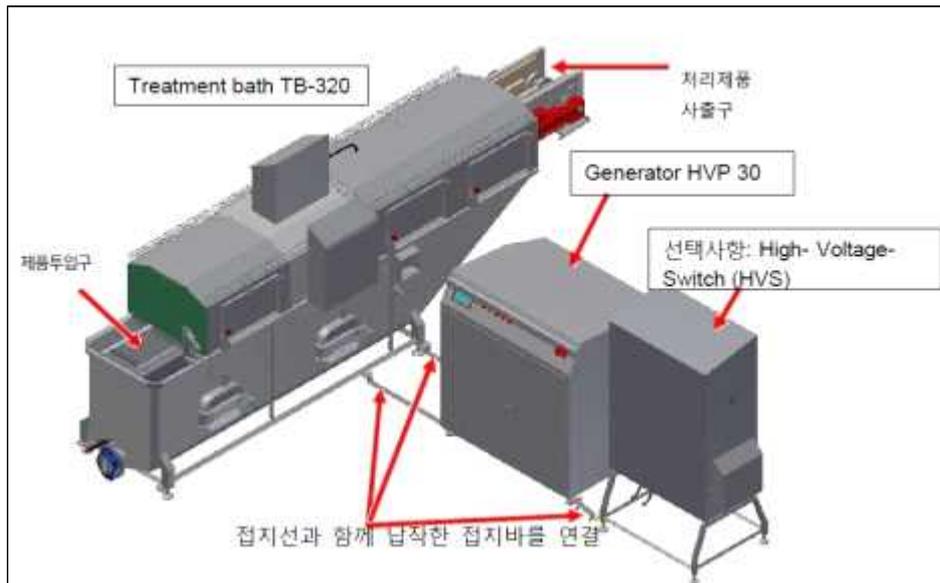


Fig 63. 브로콜리 처리를 위한 30 kw PEF 생산설비의 개요

(2) 30 kw PEF를 이용한 브로콜리의 최적 sulforaphane 증폭공정 확립

- 브로콜리의 최적 sulforaphane 증폭공정을 확립하기 위하여 ESP 저해공정과 5 kw pilot PEF 최적공정을 활용하여 생산설비의 최적조건 실험을 실시하였음.
- 30 kw PEF 처리조건은 최대로 처리 가능한 조건 energy 7 kJ을 기준으로 belt speed dial No., out voltage, frequency를 공정변수로 달리하여 대조군(Control), 1.14 kJ, 2.21 kJ, 6.95 kJ 처리를 하였음.
- PEF 처리는 조건별로 3회 반복 분석하여 비교분석을 실시하였음.

Table 32. 30kw PEF를 이용한 브로콜리의 처리조건

| 구분 | Energy (kJ/kg) | Beltspeed (m/s) | Belt speed dial No. | Charging power(kw) | Out voltage | Frequency (Hz) | Medium conductivity (us/cm) | Through put (kg/h) |
|---------|----------------|-----------------|---------------------|--------------------|-------------|----------------|-----------------------------|--------------------|
| Control | ND | 0.06 | 1.0 | ND | ND | ND | ND | ND |
| PEF1 | 1.14 | 0.27 | 3.5 | 16.8 | 65 | 200 | 231 | 1,056 |
| PEF2 | 2.21 | 0.14 | 2.0 | 16.8 | 65 | 200 | 231 | 782 |
| PEF7 | 6.95 | 0.06 | 1.0 | 22.7 | 65 | 275 | 231 | 831 |

* Ctrl : Control

- 대조군(Control)의 경우 브로콜리 원물을 ESP 저해공정인 60℃, 7 min 처리를 한 후 belt speed dial No 1.0 (0.06 m/s)조건으로 Treatment Bath TB-320을 펄스 자기장 없이 통과를 하였으며, 통과 후 브로콜리는 다듬어서 40℃ 조건에서 2 h 동안 효소전환을 유도 하였고, 효소전환 후 믹서로 균질하게 갈은 후 20 g에 물 100 mL (5배수), methanol 300 mL (15배수)를 첨가하여 3 h 동안 교반추출을 하였음.
- PEF 처리군의 경우 브로콜리 원물 ESP 저해공정인 60℃, 7 min 처리를 한 후, 각각의 PEF 처리 조건(1.14 kJ, 2.21 kJ, 6.95 kJ)에 따라 30 kw PEF로 처리하였으며, 처리 후 브로콜리는 다듬어서 40℃ 조건에서 2 h 동안 효소전환을 유도하였고, 효소전환 후 믹서로 균질하게 갈은 후 20 g에 물 100 mL (5배수), methanol 300 mL (15배수)를 첨가하여 3 h 동안 교반추출을 하였음.
- 추출 후 상등액은 회수하여 50% methanol로 50배 희석하여 0.2 μm syringe filter를 하여 UPLC-MS/MS로 분석을 진행하였음.

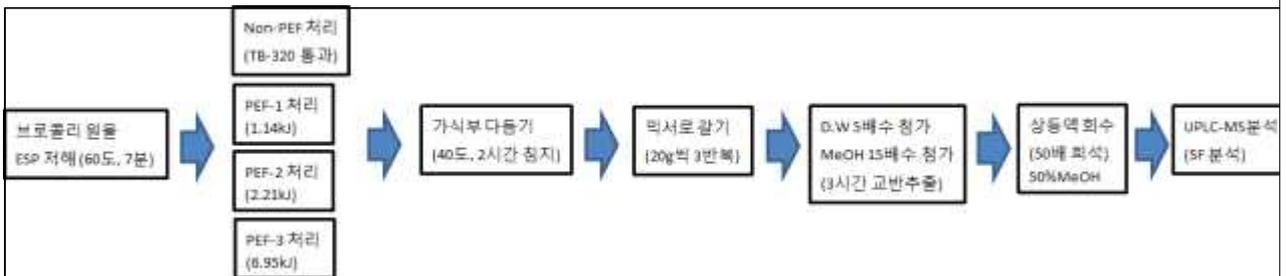


Fig 64. 30 kw PEF를 이용한 브로콜리의 처리 및 분석방법

Table 33. 30kw PEF를 이용한 브로콜리의 처리조건에 따른 sulforaphane 함량

(단위 : mg/100g D.W)

| 구분 | Control | PEF-1 | PEF-2 | PEF-7 |
|-----------------|---------|-------|-------|-------|
| Sulforaphane 함량 | 18.64 | 15.74 | 20.66 | 52.11 |

* D.W : Dry Weight

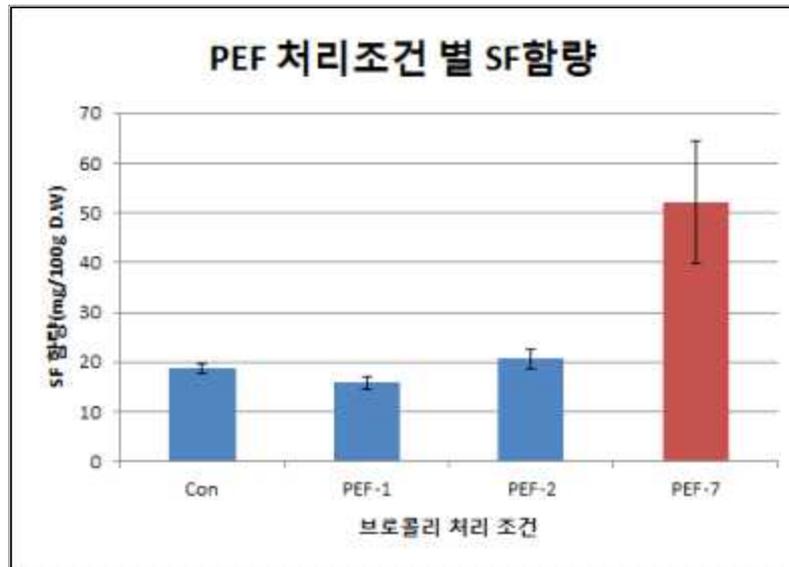


Fig 65. 30 kw PEF 처리조건에 따른 브로콜리의 sulforaphane 함량

- 30 kw PEF를 이용한 브로콜리의 처리조건에 따른 sulforaphane 함량을 분석한 결과 대조군 (Control) 18.64 mg/100 g D.W, PEF - 1 15.74 mg/100 g D.W, PEF-2 20.66 mg/100 g D.W, PEF-3 52.11 mg/100 g D.W으로 분석되었음.
- Sulforaphane의 함량은 PEF-7 > PEF-2 > Control > PEF-1 순으로 PEF-7(6.95 kJ)처리한 브로콜리의 경우가 가장 많이 증폭되었음.
- PEF-7의 경우 대조군(Control)보다 2.8배 이상 sulforaphane이 증폭된 것으로 확인되었음.
- 30 kw PEF 기기를 이용하여 산업적으로 브로콜리를 처리할 시 최적 조건은 ESP 저해공정 후 PEF-7 조건(belt speed dial No 1.0, out voltage 65%, frequency 275 Hz : 6.95 kJ)으로 처리한 브로콜리의 경우가 sulforaphane의 함량이 가장 우수한 것으로 평가되었음.

나. Scale Up을 통한 브로콜리의 sulforaphane 분석

- 30 kw PEF를 이용한 sulforaphane이 증폭된 브로콜리의 재현성 확인을 위해 확립된 최적조건으로 scale up을 하여 sulforaphane의 증폭정도를 확인하였음.
- Scale up 테스트에 사용된 브로콜리의 양은 약 1,000 kg이 사용되었다.

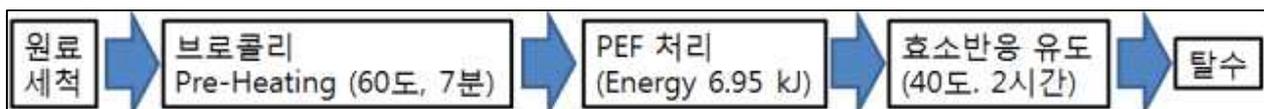


Fig 66. 30 kw PEF를 이용한 sulforaphane이 증폭된 브로콜리의 scale up 처리과정

- Scale up 공정 중 sulforaphane 함량분석은 PEF 처리 중 300 kg 단위로 처리되어 나온 브로콜리 중 무작위로 3 kg(약 8송이)를 샘플하여(총 3반복 분석) 분석에 사용하였음.
- 대조군(Control)의 경우 pre-heating(60℃, 7 min) 처리 후 PEF처리를 거치지 않은 브로콜리를 40℃ 조건에서 2 h 동안 효소반응을 유도하였으며, 반응 후 다듬어서 믹서로 갈아 균질화 하고, 균질화 된 브로콜리 20 g에 물 100 mL (5배수), methanol 300 mL (15배수)를 첨가하여 3 h 동안 교반추출을 진행하였음.
- PEF 처리군의 경우 scale up 처리공정 후 탈수된 브로콜리를 다듬어서 믹서로 갈아 균질화하고, 균질화된 브로콜리 20 g에 물 100 mL (5배수), Methanol 300 mL (15배수)를 첨가하여 3 h 동안 교반추출을 진행하였음.

Table 34. 추출 시 이용된 브로콜리의 무게 및 수분함량

| 구분 | 대조군-1 (Control) | 대조군-2 (Control) | 대조군-3 (Control) | PEF-1 | PEF-2 | PEF-3 |
|---------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|-------|-------|
| 성체무게(g) | 20.66 | 20.49 | 20.39 | 20.08 | 20.45 | 20.52 |
| 수분(%) | 88.03 | 88.03 | 88.03 | 88.03 | 88.03 | 88.03 |
| 건조중량(g) | 2.47 | 2.45 | 2.44 | 2.40 | 2.45 | 2.46 |

Table 35. 30kw PEF를 이용한 브로콜리의 SF함량

(단위 : mg/100g D.W)

| Sulforaphane 함량 | 대조군(Control) | PEF 처리군 |
|-----------------|--------------|---------|
| 1 | 47.1 | 21.34 |
| 2 | 50.21 | 20.35 |
| 3 | 44.21 | 24.56 |
| 평균 | 47.17 | 22.08 |
| 표준편차 | 3.00 | 2.20 |

* D.W : Dry Weight

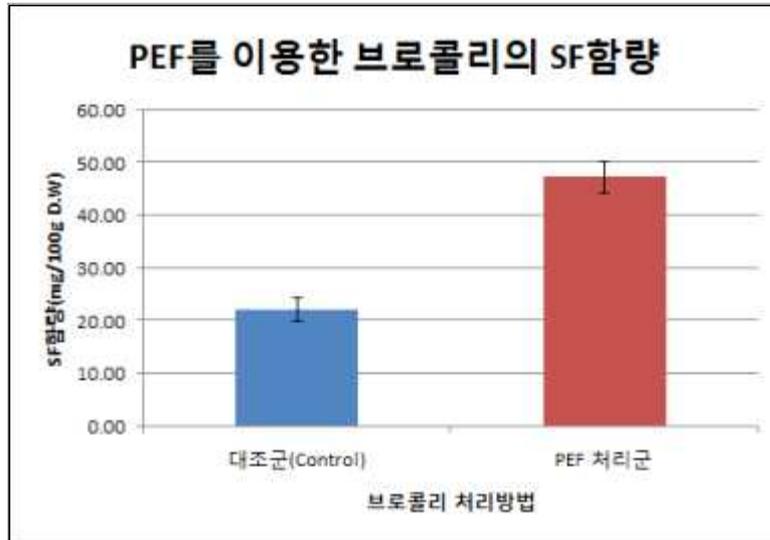


Fig 67. 30 kw PEF를 이용한 브로콜리의 비교분석

- 30 kw PEF를 이용한 브로콜리의 scale up을 진행한 결과 대조군(Control)의 경우 sulforaphane 함량이 22.08 mg/100 g D.W이며, PEF 처리를 한 경우 47.17 mg/100 g D.W이 확인되었음.
- 30 kw PEF를 이용하여 약 1,000 kg의 브로콜리를 처리하여 sulforaphane의 증폭이 2배 이상 되었음을 확인하였음.

5. PEF 처리 농산물의 물리, 화학적 품질 특성 평가 비교와 안정성 평가, 가공적성 연구, 품질관리 등 품질 기준 규격 가이드 설정

가. 표준화 분석법을 통한 PEF 처리 브로콜리의 경도 및 물성평가

- 브로콜리의 PEF 처리 조건에 따른 물성비교를 위하여 texture analyzer (T.A)와 TA9 needle(1.0mm D, 43 mm L)을 활용하여 물성을 평가하였음.
- 브로콜리의 물성비교를 위해 이용한 PEF는 생산용 30kw PEF를 활용하였음.
- 브로콜리의 PEF처리 방법은 PEF처리조건에 따라 수세한 원물을 각각 대조군(Control) : 비처리군, PEF-1 : 1.14 kJ, PEF-2 : 2.21 kJ, PEF-7 : 6.95 kJ 처리한 후 T.A를 측정하기 적당한 부위를 다듬어서 지름 1 cm Cork Borer를 활용하여 T.A 측정용 샘플을 만들어 관통시 필요한 Load (g)값을 측정하였음.

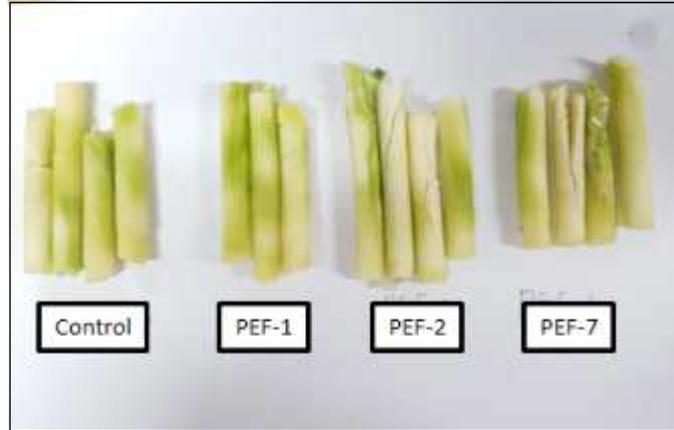


Fig 68. 브로콜리의 PEF 처리 조건에 따른 T.A측정을 위한 전처리(지름 10 mm)

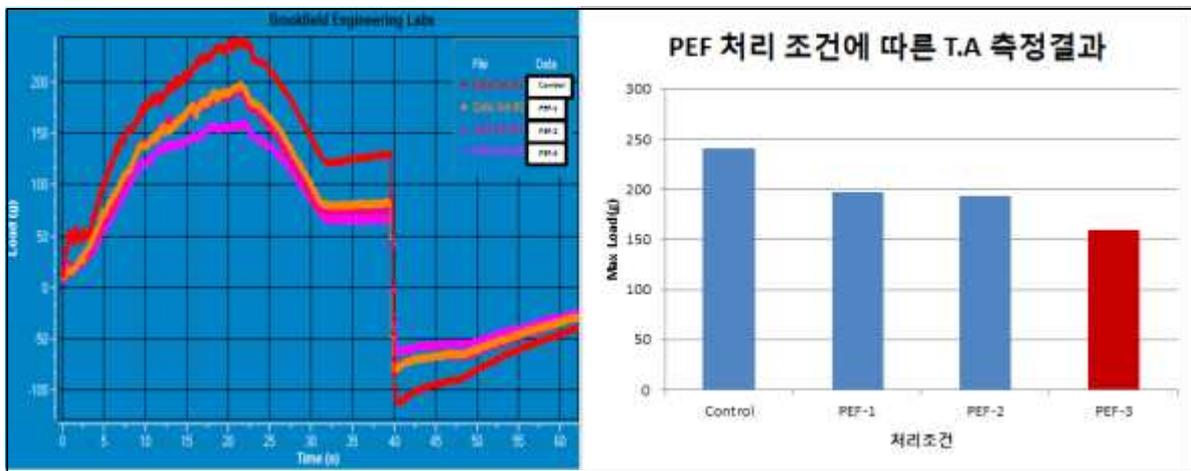


Fig 69. 브로콜리의 PEF 처리조건에 따른 T.A 측정결과

Table 36. TA9 needle을 이용한 브로콜리의 PEF 처리조건에 따른 T.A측정 결과

(단위 : g)

| 구분 | 대조군(Control) | PEF-1 | PEF-2 | PEF-7 |
|----------|--------------|-------|-------|-------|
| Max Load | 240 | 197.5 | 193 | 160 |

- 브로콜리의 PEF 처리조건에 따른 물성비교를 한 결과 대조군(240 g) > PEF-1(197.5 g) > PEF-2(193 g) > PEF-7(160 g)의 순으로 Max Load (g)가 측정되었음.
- PEF 처리군의 경우 대조군에 비해 유의적으로 Load 값이 낮아지는 것을 확인하였으며, 특히 sulforaphane 증폭의 최적조건인 PEF-7 처리군의 경우 대조군에 비해 1.5배 이상 낮아짐으로써 PEF 처리가 브로콜리의 조직감을 개선하였음.

나. 표준화 분석법을 통한 PEF 처리 브로콜리의 pH, 수분, 당도, 색가 평가



Fig 70. PEF 처리 브로콜리의 pH, 수분, 당도, 색가 측정을 위한 전처리 (위 : 착즙액, 아래 : 같은것)

- PEF 처리한 브로콜리의 품질 평가를 위하여 pH, 수분, 당도, 색가를 측정하였음.
- 브로콜리의 PEF 처리 방법은 PEF 처리조건에 따라 수세한 원물을 각각 대조군(Control) : 비처리군, PEF-1 : 1.14 kJ, PEF-2 : 2.21 kJ, PEF-7 : 6.95 kJ 처리한 후 각각의 표준화 분석법에 의해 pH, 수분, 당도, 색가를 측정하였음.
- pH의 경우 PEF 조건에 따라 처리한 브로콜리를 착즙기를 통해 착즙액을 얻었으며, METTLER TOLEDO 제품인 pH meter를 이용하여 pH를 측정하였음.
- 수분측정의 경우 PEF 조건에 따라 처리한 브로콜리를 믹서로 갈아 균질화한 후 시료를 0.5 ~ 1 g 취한 후 OHAUS/MB45 제품인 수분측정기를 이용하여 수분 함량을 측정하였음.
- 당도의 경우 PEF 조건에 따라 처리한 브로콜리를 착즙기를 통해 착즙 액을 얻었으며, 당도계(ATAGO, Digital)를 이용하여 당도(Brix, %)를 측정하였음.
- 색가의 경우 PEF 조건에 따라 처리한 브로콜리를 믹서로 균질화한 시료와 착즙기를 통해 얻은 착즙액을 Konicaminolta/CM-5 제품을 이용하여 액상(착즙액)과 고체(균질화 시료) 두 가지를 명도(L*), 적색도(a*), 황색도(b*)를 측정하였음.

Table 37. PEF 처리에 의한 브로콜리의 pH, 수분함량, 당도

| 구분 | 대조군 | PEF-1 | PEF-2 | PEF-7 |
|-------------|------|-------|-------|-------|
| pH | 6.34 | 6.38 | 6.39 | 6.36 |
| 수분함량(%) | 89.8 | 90.55 | 90.58 | 90.04 |
| 당도(Brix, %) | 7.0 | 7.1 | 7.2 | 7.5 |

Table 38. PEF 처리에 의한 브로콜리의 색가(L, a, b)

| 구분 | L*(D65) | | a*(D65) | | b*(D65) | |
|-------|---------|-------|---------|--------|---------|-------|
| | 착즙액 | 같은것 | 착즙액 | 같은것 | 착즙액 | 같은것 |
| 대조군 | 2.73 | 48.83 | -2.5 | -11.66 | 4.37 | 36.03 |
| PEF-1 | 2.33 | 48.65 | -2.14 | -11.67 | 3.70 | 36.37 |
| PEF-2 | 2.45 | 46.98 | -2.34 | -11.83 | 4.12 | 36.68 |
| PEF-7 | 2.89 | 44.11 | -2.77 | -11.76 | 4.71 | 35.42 |

- PEF 처리에 의한 브로콜리의 pH 측정결과 대조군(6.34), PEF-1(6.38), PEF-2(6.39), PEF-7(6.36)으로 pH는 6.3~6.4 수준으로 대조군과 PEF 처리군이 유사하였음.
- PEF 처리에 의한 브로콜리의 수분함량(%)은 대조군(89.8), PEF-1(90.55), PEF-2(90.58), PEF-7(90.04)으로 수분함량은 89 ~ 91 이었으며, PEF 처리군의 경우 90%이상의 수분함량을 나타내었음.
- PEF처리에 의한 브로콜리의 당도(Brix, %)는 대조군(7.0), PEF-1(7.1), PEF-2(7.2), PEF-7(7.5)로써 당도(Brix)는 7.0 ~ 7.5 이었으며, PEF 최적 처리조건인 PEF-7의 경우 7.5%로 대조군에 비해 0.5% 더 높았음.
- 색가의 경우 PEF 처리군과 대조군간의 차이는 크지 않았으며, 같은 브로콜리의 경우 명도(L*, 44.11 ~ 48.83), 적색도(a*, -11.66 ~ -11.83), 황색도(b*, 35.42 ~ 36.68) 이었으며, 착즙 액의 경우 명도(L*, 2.33 ~ 2.89), 적색도(a*, -2.14 ~ -2.77), 황색도(b*, 3.70 ~ 4.71)으로 확인되었음.

다. PEF 처리 브로콜리의 품질 기준 규격 가이드 설정

- 브로콜리의 항암활성을 나타내는 성분인 sulforaphane 함량을 지표성분으로 설정 하였다.
- 위탁기관인 어랑진에서 제공하는 브로콜리를 기준으로 sulforaphane을 20 mg/100 g D.W을 기준 규격으로 설정하였음.
- 아무 처리를 하지 않은 브로콜리의 경우 재배시기, 원산지, 원물의 상태에 따라 sulforaphane 함량

은 차이가 많기 때문에 슈퍼콜리 기준규격(sulforaphane 함량 20 mg/100 g D.W)에 적합하기 위해서는 입고검사 시 원물 브로콜리의 sulforaphane의 함량은 10 mg/100 g D.W이상으로 브로콜리를 사용하는 것으로 기준하였음.

- PEF를 처리한 브로콜리의 물리, 화학적 분석 결과를 토대로 수분 함량 91% 이하, pH 6.4 이하, 당도 7.1 brix 이상, texture analyzer (needle) 160 g 이하를 기준 규격으로 설정하였음.



제주특별자치도 제주시 구좌읍 일주봉로 2706-38 (우 : 695-982) 전화 064-753-8600 팩스 064-782-6188

Technical Data Sheet

SUPERCCOLI®

슈퍼콜리

CHARACTERISTICS
PEF 기술을 적용한 Sulforaphane 함량이 증폭된 제주산 브로콜리

| ANALYSIS | SPECIFICATIONS |
|--|-------------------------|
| Appearance : | Broccoli |
| Colour | Green |
| odour | Odorless |
| Moisture | < 91 % |
| pH (Juice Liquid) | < 6.4 |
| Brix (Juice Liquid) | > 7.1 % |
| Sulforaphane | > 20 mg/100g Dry Weight |
| Texture Analyzer(TA9Needle, 1.0mm D, 43mm L) | > 160g (10mm ID) |

| MICROBIOLOGY | |
|---------------------------|-------------------|
| Total Plate Count : | < 100,000 cfu/g |
| E. coli : | < 10 cfu/g |
| Staphylococcus aureus | < 100 cfu/g |
| Salmonella | n=5, c=0, m=0/25g |
| Bacillus cereus | < 1,000 cfu/g |
| Enterohemorrhagic E. coli | n=5, c=0, m=0/25g |
| Clostridium | < 100 cfu/g |

PACKAGING
2ea, bag

STORAGE
store in keep refrigerated (> 4°C)
Best use within : 7 day.

Fig 71. 제주산 브로콜리를 이용한 슈퍼콜리 기준규격

Technical Data Sheet

SUPERCCOLI®

슈퍼콜리

Production flow chart

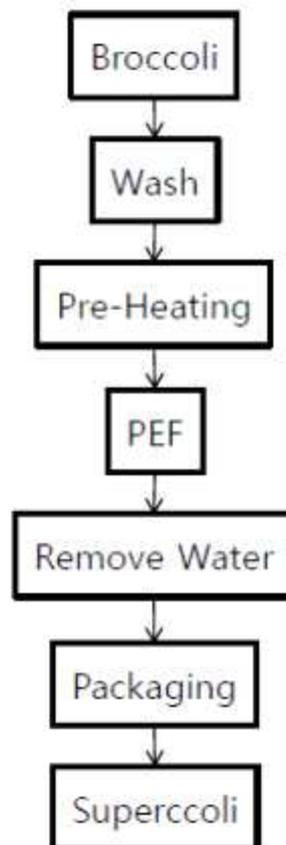


Fig 72. 제주산 브로콜리를 이용한 슈퍼콜리 제조 공정도

6. PEF 처리 브로콜리의 분말화 연구 및 엑기스 제조를 위한 추출법 개발

가. 표준화된 분석법을 통한 브로콜리 분말의 물리, 화학적 품질 및 특성 평가

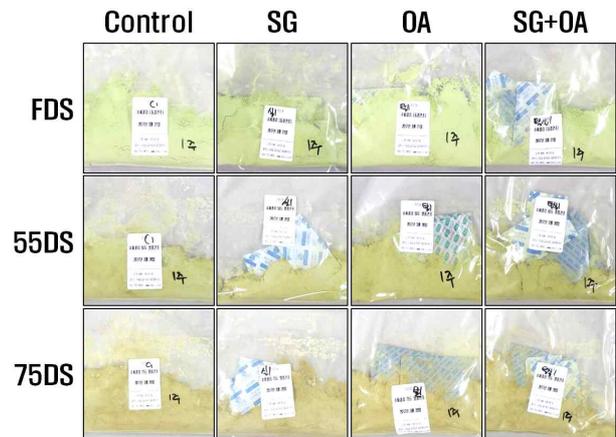
(1) 표준화된 분석법을 통한 브로콜리 분말의 색가 평가

- 1차년도 및 2차년도 실험결과에서는 PEF 처리에 의해 기능성 성분인 sulforaphane 증폭이 가장 우수한 브로콜리를 이용하여 PEF 처리 후 분말화된 것을 색가 측정을 통해 품질 평가를 실시하였음.
- 본 실험을 실시하기 위하여 위탁기관인 어랑진 영농조합법인에서 제공하는 브로콜리를 기준으로 실시하였음. 제공받은 브로콜리는 SK3-085종을 사용하였으며, 02~03월 달에 제주도 한림읍 지역에서 재배된 브로콜리를 이용하였음.
- 입고된 브로콜리의 이물을 제거하기 위하여 세척한 후 초기미생물 제어를 위해 미산성수를 이용해 살균하였음. 브로콜리 내 glucoraphanin를 myrosinase 효소작용을 통해 기능성분인 sulforaphane을 증폭시키기 위하여 30 kW PEF 기기를 사용하였음. 전기장 처리를 위해 PEF 기기 설정은 specific energy 7 kJ, frequency 90~100 Hz, 그리고 belt speed 1.0으로 맞추어 진행하였음. Belt chamber를 통해 PEF 처리된 브로콜리는 2 h 동안 상온에서 효소반응을 유도한 후 건조조건에 따라 건조되었음.
- 건조 조건에 따른 브로콜리 분말 상태에 따라 색가를 측정하기 위해 동결건조, 55℃ 및 75℃ 열풍건조된 브로콜리의 3가지 군으로 나누어 건조하였음. 동결건조된 분말을 위하여 제주테크노파크 내 대용량 동결건조기(Lyophilizer, PVTFD 300R, IIShinBioBase)를 약 3일 동안 동결건조 하였으며, 55℃ 및 75℃ 열풍건조를 위하여 당사의 열풍건조기(한라바이오랩)를 이용하여 건조하였음. 건조 후 분말 미분쇄를 위해 당사 분쇄기(PC14SU15-PT, 성장기계)를 사용하여 PEF 처리된 브로콜리 분말을 제작하였음. 미분쇄된 분말은 진공포장지에 담아 매주 분석하였음.
- 어랑진 영농조합법인으로부터 제공받은 브로콜리 약 200 kg을 이용하여 실험을 진행하였음.
- 색가 측정은 Konicaminolta/CM-5 측정기기를 이용하여 명도(L*), 적색도(a*), 황색도(b*)를 측정하였으며, 각 처리군에 따라 3회 반복하여 측정하였음.

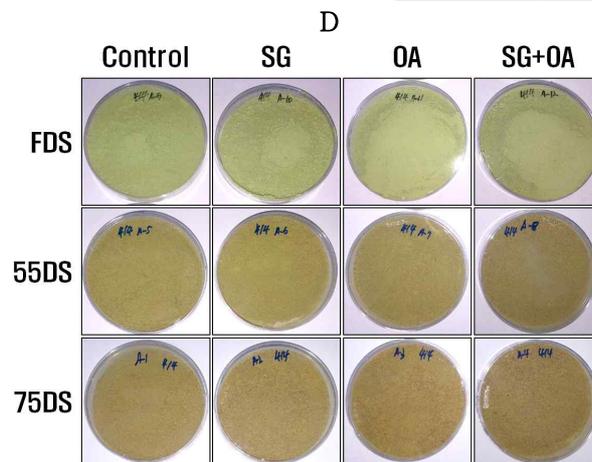
A



B



C



D

Fig 73. Sulforaphane이 향상된 브로콜리의 분말화를 통한 저장기간 동안의 특성 평가 (FDS : free-dried superccoli, 55DS : superccoli dried by got air at 55°C, 75DS : superccoli dried by hot air at 75°C, SG : silica gel, OA : oxygen absorber)

- PEF 처리에 의해 기능성성분인 sulforaphane이 증가된 브로콜리를 건조 공정에 따른 분말화 최적 공정을 설정하였음. PEF 처리된 브로콜리를 동결건조, 55°C 및 75°C에서 열풍건조에 따른 차이 및 저장기간에 따른 분말의 색도를 측정하였음.
- 건조가 끝난 FDS, 55DS, 그리고 75DS를 비교하였을 때 동결건조의 색상이 가장 브로콜리 원물과 유사한 색을 나타내었으나, 55DS와 75DS는 열반응에 의해 변색되었음을 확인하였음. Konicaminolta/CM-5에 의해 측정한 결과, FDS의 경우 명도 63.35, 적색도 -3.14, 그리고 황색도 31.27를 나타내었으며, 55DS는 명도 60.44, 적색도 0.87, 그리고 황색도 29.11의 값을 나타내었음. 또한 75DS는 명도 73.58, 적색도 -9.22, 그리고 황색도 28.80을 나타내었음. 이는 FDS, 55DS, 그리고 75DS의 순서로 명도가 증가하고 적색도 및 황색도가 감소하는 것을 나타내었음.
- 또한 FDS, 55DS, 그리고 75DS를 19주까지 저장하였을 때 분말 상태를 확인하고자 하였으며, 건조 방법에 따라 차이를 나타낸 FDS, 55DS, 그리고 75DS에 대해 저장기간에 따른 분말 색도에 영향을 미치는지 확인하고자 하였음. 또한 저장기간에 따라 PEF 처리된 브로콜리 분말의 관능적

인 특성 손실을 최소화하기 위하여 실리카겔 및 탈산소제를 사용하여 브로콜리 분말에 미치는 영향을 확인하고자 하였음.

- FDS, 55DS, 그리고 75DS는 진공비닐의 상태로 보관 하였으며, 대조군, 실리카겔군, 탈산소제군, 실리카겔 및 탈산소제군의 총 4개 군으로 나누어 평가하였으며, 각 실험은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 그리고 19주에 실시하였음.
- 그 결과 FDS의 SG, OA, 그리고 SG+OA군에서는 시간의존적으로 L, a, b의 값이 감소하였음. 또한 55DS와 75DS도 유사하게 수치가 감소하였음.

Table 39. 동결건조 조건에 따른 PEF 처리된 브로콜리의 색가 평가

| 건조조건 | | FDS | | | | | | | | | | | |
|------|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Control | | | SG | | | OA | | | SG+OA | | |
| 포장형태 | | L | a | b | L | a | b | L | a | b | L | a | b |
| 색도 | | L | a | b | L | a | b | L | a | b | L | a | b |
| Ctrl | 평균 | 73.57 | -9.22 | 28.77 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S.D. | 0.005 | 0.009 | 0.052 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1주 | 평균 | 72.94 | -9.63 | 29.78 | 73.31 | -9.46 | 29.47 | 72.65 | -9.66 | 29.75 | 73.19 | -9.23 | 27.99 |
| | S.D. | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.04 | 0.01 | 0.01 | 0.04 | 0.02 | 0.04 | 0.03 | 0.02 |
| 2주 | 평균 | 72.89 | -9.53 | 29.62 | 72.93 | -9.41 | 30.13 | 72.66 | -9.82 | 29.84 | 72.60 | -9.01 | 29.32 |
| | S.D. | 0.01 | 0.02 | 0.03 | 0.07 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.02 | 0.06 | 0.00 | 0.01 | 0.02 |
| 3주 | 평균 | 72.69 | -9.24 | 29.44 | 71.28 | -8.84 | 30.58 | 72.67 | -9.41 | 30.31 | 71.48 | -8.70 | 30.16 |
| | S.D. | 0.01 | 0.04 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.03 | 0.01 | 0.04 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| 4주 | 평균 | 72.56 | -8.55 | 29.08 | 69.18 | -7.84 | 32.11 | 73.33 | -8.61 | 28.45 | 72.57 | -8.28 | 27.32 |
| | S.D. | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| 5주 | 평균 | 72.56 | -8.56 | 28.70 | 73.28 | -8.70 | 28.34 | 69.15 | -7.90 | 32.10 | 72.11 | -8.27 | 29.65 |
| | S.D. | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.04 | 0.02 | 0.01 | 0.04 | 0.02 |
| 6주 | 평균 | 72.61 | -8.47 | 29.16 | 69.40 | -7.73 | 32.48 | 73.56 | -8.39 | 27.99 | 72.27 | -7.84 | 28.81 |
| | S.D. | 0.02 | 0.05 | 0.02 | 0.02 | 0.05 | 0.02 | 0.01 | 0.05 | 0.01 | 0.01 | 0.04 | 0.01 |
| 7주 | 평균 | 72.97 | -7.80 | 28.66 | 69.30 | -6.90 | 32.10 | 71.05 | -7.29 | 30.15 | 73.23 | -7.92 | 27.74 |
| | S.D. | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.04 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| 8주 | 평균 | 72.22 | -7.91 | 29.16 | 69.30 | -6.76 | 29.06 | 72.63 | -8.01 | 28.89 | 68.96 | -7.61 | 32.32 |
| | S.D. | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.00 |
| 19주 | 평균 | 69.64 | -4.85 | 30.34 | 58.43 | 5.54 | 36.11 | 71.07 | -5.64 | 29.15 | 66.50 | -1.75 | 34.67 |
| | S.D. | 0.02 | 0.05 | 0.03 | 0.03 | 0.05 | 0.04 | 0.02 | 0.06 | 0.02 | 0.02 | 0.06 | 0.05 |

* FDS : Free-dried superccoli
 * Ctrl : Control
 * SG : Silica gel
 * OA : Oxygen absorber

Table 40. 55°C 열풍건조 조건에 따른 PEF 처리된 브로콜리의 색차 평가

| 건조조건 | | 55DS | | | | | | | | | | | |
|------|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 포장형태 | | Control | | | SG | | | OA | | | SG+OA | | |
| 색도 | | L | a | b | L | a | b | L | a | b | L | a | b |
| Ctrl | 평균 | 63.35 | -3.14 | 31.27 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S.D. | 0.01 | 0.03 | 0.02 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1주 | 평균 | 63.03 | -2.77 | 31.45 | 62.65 | -2.65 | 31.61 | 63.18 | -2.98 | 31.05 | 63.56 | -2.99 | 30.39 |
| | S.D. | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.00 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.02 |
| 2주 | 평균 | 63.56 | -2.58 | 30.81 | 62.62 | -2.25 | 31.88 | 63.03 | -2.44 | 30.75 | 63.15 | -2.33 | 31.25 |
| | S.D. | 0.01 | 0.04 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 3주 | 평균 | 62.80 | -1.57 | 30.91 | 61.90 | -1.38 | 31.91 | 63.30 | -2.28 | 31.32 | 62.92 | -1.89 | 32.01 |
| | S.D. | 0.01 | 0.04 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.00 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| 4주 | 평균 | 62.58 | -1.37 | 31.95 | 62.26 | -1.29 | 31.92 | 62.90 | -1.71 | 31.09 | 65.76 | -3.58 | 30.87 |
| | S.D. | 0.60 | 0.34 | 0.43 | 0.73 | 0.60 | 0.92 | 0.42 | 0.46 | 0.53 | 5.28 | 3.85 | 1.39 |
| 5주 | 평균 | 62.59 | -1.14 | 31.47 | 63.24 | -1.77 | 30.84 | 61.49 | -0.52 | 32.62 | 61.88 | -0.92 | 32.09 |
| | S.D. | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.04 | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.02 | 0.05 | 0.03 |
| 6주 | 평균 | 61.55 | -0.87 | 31.77 | 60.88 | -0.70 | 32.60 | 62.88 | -1.63 | 31.10 | 62.14 | -1.11 | 32.06 |
| | S.D. | 0.01 | 0.04 | 0.03 | 0.01 | 0.03 | 0.04 | 0.02 | 0.05 | 0.03 | 0.02 | 0.05 | 0.02 |
| 7주 | 평균 | 62.37 | -0.51 | 31.38 | 60.11 | 0.84 | 33.10 | 63.08 | -1.38 | 30.45 | 62.14 | -0.40 | 31.95 |
| | S.D. | 0.01 | 0.03 | 0.03 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.00 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| 8주 | 평균 | 62.23 | -0.46 | 31.66 | 61.09 | 0.09 | 32.19 | 62.88 | -1.22 | 30.72 | 61.48 | -0.12 | 32.87 |
| | S.D. | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.04 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.02 |
| 19주 | 평균 | 59.73 | 2.47 | 30.80 | 61.26 | 1.06 | 30.37 | 57.38 | 3.69 | 32.53 | 56.67 | 4.32 | 32.46 |
| | S.D. | 0.01 | 0.04 | 0.03 | 0.01 | 0.04 | 0.01 | 0.03 | 0.06 | 0.03 | 0.02 | 0.04 | 0.03 |

* 55DS : Superccoli dried by hot air at 75°C

* Ctrl : Control

* SG : Silica gel

* OA : Oxygen absorber

Table 41. 75°C 열풍건조 조건에 따른 PEF 처리된 브로콜리의 색차 평가

| 건조조건 | | 75DS | | | | | | | | | | | |
|------|------|---------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|
| 포장형태 | | Control | | | SG | | | OA | | | SG+OA | | |
| 색도 | | L | a | b | L | a | b | L | a | b | L | a | b |
| Ctrl | 평균 | 60.44 | 0.87 | 29.11 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | S.D. | 0.01 | 0.01 | 0.01 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 1주 | 평균 | 61.46 | 0.58 | 27.69 | 60.55 | 0.85 | 28.65 | 61.30 | 0.64 | 26.68 | 60.58 | 0.81 | 28.44 |
| | S.D. | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----|------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|
| 2주 | 평균 | 60.51 | 1.04 | 28.24 | 61.13 | 0.97 | 27.66 | 59.14 | 1.57 | 30.37 | 59.63 | 1.41 | 29.47 |
| | S.D. | 0.22 | 0.10 | 0.06 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 3주 | 평균 | 60.01 | 1.49 | 29.85 | 58.59 | 1.97 | 31.78 | 60.71 | 1.16 | 29.28 | 59.70 | 1.42 | 30.50 |
| | S.D. | 0.01 | 0.04 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.00 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.01 |
| 4주 | 평균 | 59.69 | 1.68 | 29.48 | 59.51 | 1.58 | 29.54 | 60.12 | 1.40 | 28.47 | 59.73 | 0.85 | 30.90 |
| | S.D. | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 1.25 | 0.40 | 1.61 | 1.55 | 0.49 | 1.58 | 2.52 | 1.91 | 0.60 |
| 5주 | 평균 | 61.03 | 1.24 | 27.84 | 60.62 | 1.42 | 28.43 | 57.32 | 2.63 | 32.07 | 57.65 | 2.43 | 31.83 |
| | S.D. | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.04 | 0.01 |
| 6주 | 평균 | 59.13 | 1.97 | 29.51 | 57.90 | 2.36 | 31.34 | 60.91 | 1.32 | 28.68 | 59.29 | 1.94 | 30.58 |
| | S.D. | 0.01 | 0.04 | 0.02 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.04 | 0.01 | 0.01 | 0.04 | 0.01 |
| 7주 | 평균 | 58.66 | 2.36 | 30.03 | 57.05 | 3.23 | 31.84 | 60.46 | 1.55 | 27.76 | 57.86 | 2.76 | 31.27 |
| | S.D. | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 8주 | 평균 | 59.37 | 2.11 | 29.81 | 58.34 | 2.55 | 32.06 | 60.91 | 1.52 | 27.99 | 57.20 | 3.00 | 32.24 |
| | S.D. | 0.01 | 0.03 | 0.02 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.06 | 0.01 | 0.03 |
| 19주 | 평균 | 57.38 | 3.68 | 29.39 | 52.14 | 6.29 | 31.92 | 58.89 | 2.66 | 28.84 | 52.99 | 5.93 | 30.99 |
| | S.D. | 0.01 | 0.04 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.04 | 0.01 | 0.02 | 0.04 | 0.01 |

* 75DS : Superccoli dried by hot air at 75°C

* Ctrl : Control

* SG : Silica gel

* OA : Oxygen absorber

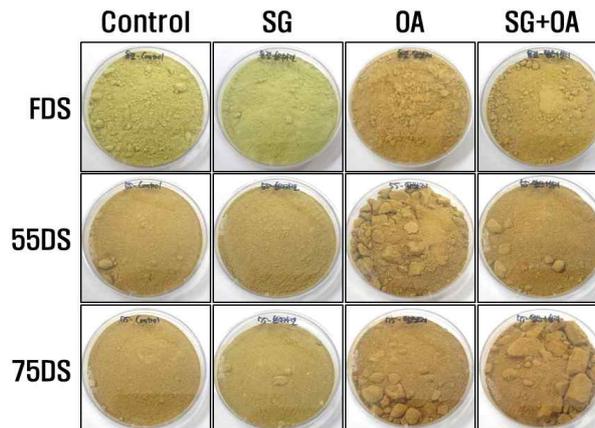


Fig 74. Sulforaphane이 향상된 브로콜리의 분말의 장기간 저장에 따른 특성 평가

(FDS : Free-dried super-broccoli, 55DS : Super-broccoli dried by hot air at 55°C, 75DS : Super-broccoli dried by hot air at 75°C)

- 분말 제작 후 FDS, 55DS, 그리고 75DS를 장기간 저장하였을 때 분말의 특성을 관찰하였음. FDS의 경우 control, SG, OA 및 SG+OA의 결과에 따르면 명도(69.64, 58.43, 71.07 및 66.50), 적색도(-4.85, 5.54, -5.64 및 -1.75) 그리고 황색도(30.34, 36.11, 29.15 및 34.67)를 나타내었음. 55DS

는 명도(59.73, 61.26, 57.38 및 56.67), 적색도(2.47, 1.06, 3.69 및 4.32)를 결과를 보였음. 게다가 75DS는 명도(57.38, 52.14, 58.89 및 52.99), 적색도(3.68, 6.29, 58.89 및 52.99) 그리고 황색도(29.69, 31.92, 28.84 및 30.99)을 나타내었음. FDS, 55DS, 그리고 75DS의 결과를 종합하면 전체적으로 분말의 갈변화가 진행되었으며, 색차 결과에서도 동일한 결과를 나타내었음. 대조군 대비 저장기간 중 SG을 함께 넣었을 경우 FDS, 55DS, 그리고 75DS 처리군에서 색도 변화가 가장 적었음.

(2) 표준화된 분석법을 통한 브로콜리 분말의 미생물 평가

- FDS, 55DS, 그리고 75DS의 건조방법에 따라 SG, OA, 그리고 SG+OA를 넣어 실험군을 달리하여 실험하였음. 모든 실험군은 진공포장지에 포장 후 진공한 상태로 상온에서 보관되었음.
- 각 FDS, 55DS, 그리고 75DS는 멸균된 0.1%(w/w) 펩톤수에 10배수로 1차 희석되었으며, 희석된 FDS, 55DS, 그리고 75DS는 stomacher(WS-400, (주)세니원이엔티) 균질화 하였음. 일반세균 및 대장균군은 페트리필름(3M Petri film™, St. Poul, MN, USA)에 각각 분주하였음. 분주된 일반세균 및 대장균군 페트리필름은 37°C에서 2 day 동안 배양하였음.
- Table 42의 결과에 따르면 일반세균의 경우 FDS, 55DS, 그리고 75DS 처리된 대조군은 3.2, TNTC, 그리고 4.4 log CFU/mL를 보였음. 8주까지 진행된 분말의 FDS 처리군의 일반세균은 8주차에도 큰 영향을 미치지 않았으며, 75DS 또한 대조군 대비 유사한 결과를 나타내었음. 그러나 55DS 처리군은 초기에서부터 미생물을 제어하지 못하였음. 이는 55°C 열풍건조기에 의해 살균효과를 나타내지 못하였으며, 일반세균의 살균조건에 영향을 미치지 못하였음.
- 대장균군의 경우 FDS, 55DS, 그리고 75DS 대조군은 0, 3.5, 그리고 2.4 log CFU/mL를 나타내었음. 이후 8주까지의 결과를 보면 FDS 처리군은 모두 대조군이 나타나지 않았으며, 55DS 및 75DS 일정한 수준을 나타내었음.
- FDS, 55DS, 그리고 75DS 분말화의 저장기간에 따른 결과는 동결건조를 한 후 실리카겔에 의해 수분이 제거된 상태에 저장하였을 경우 미생물 증식을 최소화할 수 있으며, 대장균군의 존재 또한 전무한 상태로 제품을 생산할 수 있음.

Table 42. FDS, 55DS, 그리고 75DS 분말의 저장상태에 따른 미생물학적 안전성 평가

(단위 : log CFU/mL)

| 항목 | | Ctrl | 1주 | 2주 | 3주 | 4주 | 5주 | 6주 | 7주 | 8주 | |
|-----|-------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 일반균 | FDS | Ctrl | 3.2 | 3.1 | 3.0 | 3.3 | 3.1 | 3.3 | 3.3 | 3.4 | 3.7 |
| | | SG | | 3.4 | 3.3 | 2.8 | 3.0 | 3.2 | 3.2 | 3.4 | 3.5 |
| | | OA | | 3.5 | 3.3 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.4 | 2.8 | 3.6 |
| | | SG+OA | | 3.7 | 3.7 | 4.2 | 3.3 | 3.5 | 3.5 | 3.6 | 3.6 |
| | 55 DS | Ctrl | T | T | T | T | T | T | T | T | T |
| | | SG | | T | T | T | T | T | T | T | T |
| | | OA | | T | T | T | T | T | T | T | T |
| | | SG+OA | | T | T | T | T | T | T | T | T |
| | 75 DS | Ctrl | 4.4 | 4.3 | 4.4 | 4.1 | 3.8 | 4.2 | 3.5 | 4.5 | 3.8 |
| | | SG | | 4.3 | 4.4 | 4.3 | 4.5 | 4.7 | 4.2 | 3.6 | 4.2 |
| | | OA | | 4.6 | 4.7 | 4.9 | 4.0 | 4.3 | 4.2 | 4.3 | 4.0 |
| | | SG+OA | | 3.9 | 4.5 | 4.4 | 4.5 | 4.8 | 4.3 | 4.3 | 4.1 |
| 대장균 | FDS | Ctrl | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | SG | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | OA | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | SG+OA | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 55 DS | Ctrl | 3.5 | 3.3 | 2.6 | 3.6 | 4.3 | 3.5 | 3.1 | 1.5 | 3.1 |
| | | SG | | 1.8 | 2.9 | 3.9 | 4.4 | 3.4 | T | 4.0 | 3.7 |
| | | OA | | 2.7 | T | 3.8 | 4.4 | 3.9 | 2.5 | 2.4 | 2.4 |
| | | SG+OA | | 3.3 | T | 3.4 | T | 4.0 | 4.2 | 1.7 | 2.4 |
| | 75 DS | Ctrl | 2.4 | 2.1 | 1.9 | 2.5 | 2.4 | 2.8 | 2.1 | 1.5 | T |
| | | SG | | 2.5 | 3.3 | 2.5 | 2.1 | 3.3 | 2.3 | 1.8 | 2.7 |
| | | OA | | 2.3 | - | - | 2.1 | 3.1 | 2.0 | 2.1 | 2.1 |
| | | SG+OA | | 2.4 | - | 1.7 | 2.4 | 3.2 | 2.5 | 1.2 | 2.3 |

(3) 표준화된 분석법을 통한 브로콜리 분말의 sulforaphane 안정성 평가

- 분석에 사용된 sulforaphane은 Sigma-Aldrich (USA)에서 얻었으며, acetonitrile, methanol, ethyl acetate, 그리고 dichloromethane은 Duksan Pure Chemical Co., LTD (Ansan, Korea)에서 입수 하였음. 그 이외 실험에 사용된 모든 시약은 HPLC 또는 분석 등급을 사용하였음.
- 본 연구에서 서로 다른 파장(205 nm, 235 nm 및 254 nm)을 조사한 결과, sulforaphane이 235 nm에서 가장 큰 흡광도를 나타내어, 이후 분석은 sulforaphane 분석을 위해 235 nm 파장에서

사용하였음.

- 이종 증류수를 사용 전에 진공 펌프(Millipore, Waters, Division) 및 filter (HA-0.45, Millipore, Division of Millipore, Waters)로 여과하였음. 모든 샘플을 HPLC 시스템에 주입하기 전에 filter (MFS-25, 0.2 μ m TF, Whatman, USA)를 사용하여 여과하였음. Sulforaphane 표준용액은 10 mg의 표준물질을 10 mL의 acetonitrile에 용해시켜 제조하였음.
- 화합물은 C18 column (250 \times 4.6 mm; prticle size, 3 μ m; Phenomenex, USA)을 사용하여 분리 하였음. Injector는 20 μ L sample loop로 사용되었음. Acetonitrile / H₂O (20/80, v/v)를 유속 0.5 mL/min 이동상으로 하여 sulforaphane의 HPLC 분리를 수행 하였으며, 검출은 파장 235 nm에서 실시하였음. 증류수를 사용하기 전에 진공필터여과(HA-0.45 μ m, Millipore, Waters, USA)를 통해 여과하였음.

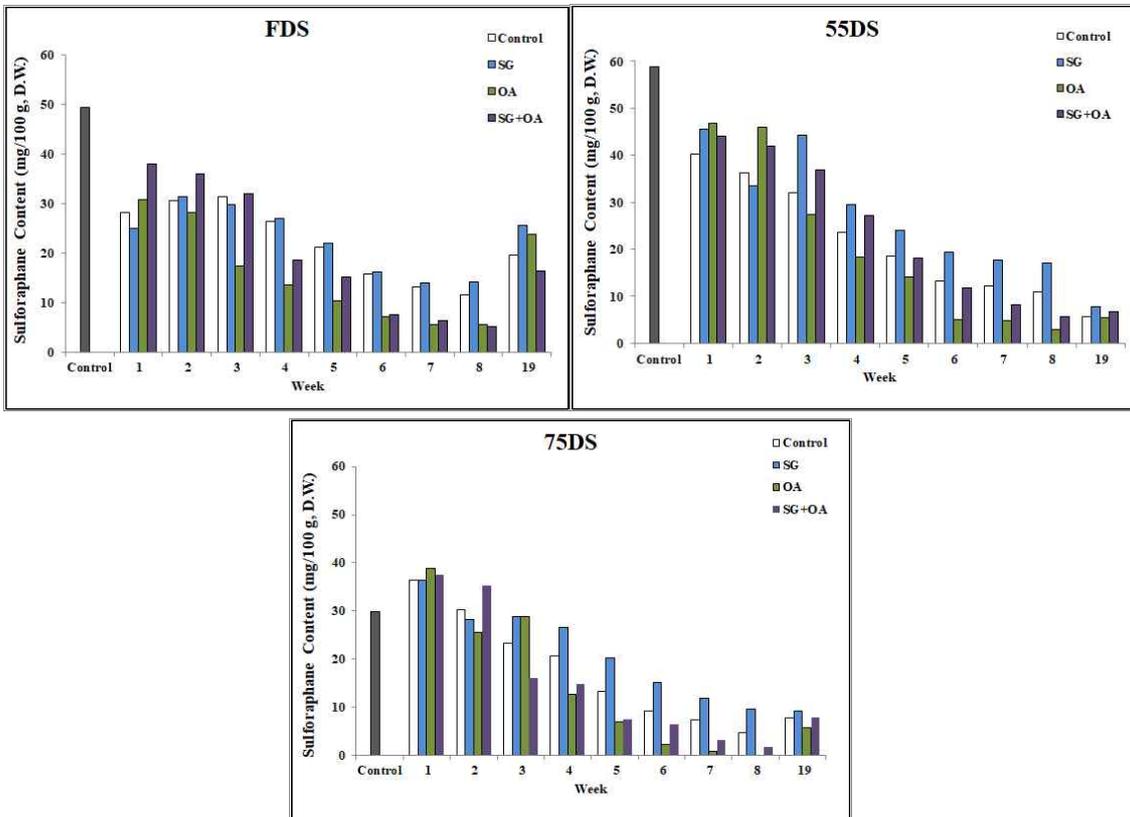


Fig 75. 건조조건에 따른 슈퍼콜리 내 sulforaphane 함량 측정

(FDS : free-dried superccoli, 55DS : superccoli dried by hot air at 55°C, 75DS : superccoli dried by hot air at 75°C, SG : silica gel, OA : oxygen absorber)

- FDS, 55DS, 그리고 75DS 건조조건에 따라 슈퍼콜리 내 sulforaphane 분석을 실시 하였음. 게다가 저장기간에 따라 분말화된 상태에서 sulforaphane의 안정성을 평가하고자 하였음. Fig 75의 결과에 따르면 열손실을 최소한으로 받는 FDS와 55DS는 49.36과 588.8 mg/100g(D.W)를 나타내

었으며, 75DS 조건에서는 298.8 mg/100g(D.W)을 나타내었음. 75DS 조건의 대조군은 다소 낮은 sulforaphane 함량을 나타내었으나, 이후 FDS와 55DS 비교하였을 때 1주차 이후 유사한 수치를 나타내었음.

- 또한 진공포장상태 내 수분을 흡수하는 SG 처리군과 산소를 흡수하는 OA 처리군, 그리고 함께 넣어준 SG+OA 처리군을 나누어 대조군과 비교하여 분말화된 슈퍼콜리 내 sulforaphane 안정성을 평가하고자 하였음.
- FDS 조건의 SG, OA, 그리고 SG+OA 처리군에서는 저장기간에 따라 시간의존적으로 sulforaphane 함량이 감소하는 것을 나타내었음. 1~8주까지 OA와 SG+OA가 함께 저장된 처리군이 SG만 처리된 군보다 낮은 sulforaphane 함량을 나타내었음. 19주에 분말화된 슈퍼콜리의 sulforaphane 함량이 다소 증가되었으나, SG와 함께 저장된 처리군에서 높은 sulforaphane 함량을 나타내었음. 또한 색도와 sulforaphane 함량을 함께 비교하였을 때 SG와 함께 저장된 처리군에서 갈변반응이 적게 일어났으며, sulforaphane 함량 또한 OA보다 낮게 손실되어 sulforaphane 안정성을 더욱 확보할 수 있을 것으로 판단됨.
- 55DS 조건의 SG, OA, 그리고 SG+OA 처리군에서는 저장기간에 따라 sulforaphane 함량이 감소하는 것을 나타내었음. FDS와 유사하게 1~8주까지 OA와 SG+OA가 함께 저장된 처리군이 시간의존적으로 SG만 처리된 군보다 낮은 sulforaphane 함량을 나타내었음. 게다가 색도와 sulforaphane을 함께 비교하였을 경우 SG 처리군이 대조군 대비 높은 sulforaphane 함유를 나타내었으나, 대조군, SG, OA, 그리고 SG+OA 모든 처리군에서 색도 변화가 높았음.
- 75DS 조건의 SG, OA, 그리고 SG+OA 처리군에서는 저장기간에 따라 시간의존적으로 sulforaphane 함량이 감소하는 것을 나타내었음. 초기 0주에서 sulforaphane 함유가 낮게 나타났으나, 1주에는 SG, OA, 그리고 SG+OA 처리군 모두 유사하였음. 이후 시간의존적으로 분말화된 슈퍼콜리 내 sulforaphane 함량이 감소하였음. SG와 함께 처리된 군에서는 OA 처리군보다 높은 sulforaphane 함량을 나타내었음.

(4) 표준화된 분석법을 통한 브로콜리 분말의 품질 규격 가이드 설정

(가) 브로콜리 분말의 한계 기준 설정을 하기 위한 실험 근거 설정

- 브로콜리 분말의 식품유형으로 설정한 과채가공품의 제조과정 중 가열살균과정 조건의 효과성을 알아보기 위해 가열살균 전·후의 시료를 채취하여 생물학적 위해요소인 병원성 미생물[황색포도상구균(*S. aureus*), 살모넬라(*Salmonella spp.*), 리스테리아 모노사이토제네스(*L. monocytogenes*), 장출혈성 대장균(*Enterohemorrhagic E. coli*), 바실러스 세레우스(*B. cereus*), 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Cl. perfringens*)], 일반세균, 대장균군, 대장균, 진균류(효모, 곰팡이), 내열성균의 사멸 정도를 확인하고자 실험을 진행하였음.

(나) 브로콜리 분말의 한계 기준 설정을 하기 위한 실험 대상

- 당사에서는 브로콜리 분말에 대해 한국식품안전관리기준(HACCP)을 인증 및 식품 안전성을 증가시키기 위하여 아래와 같이 한계 기준을 설정하고자 하였음. PEF 처리 기술을 통해 브로콜리의 기능성소재인 sulforaphane을 증가시키고 이를 분말화하여 식품안전성을 획득하고자 하였음. 기능성성분이 증가된 브로콜리의 분말은 과채가공품으로 식품유형을 구분하였음.
- 기능성이 향상된 브로콜리 분말의 제조과정 중 살균공정 조건 최적화를 설정하기 위해 아래와 같은 생물학적 위해요소인 병원성 미생물의 제어 가능성을 평가하였음.
 - 황색포도상구균(*S. aureus*), 살모넬라(*Salmonella spp.*)
 - 리스테리아 모노사이토제네스(*L. monocytogenes*)
 - 장출혈성 대장균(*Enterohemorrhagic coli, E. coli*)
 - 바실러스 세레우스(*B. cereus*)
 - 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Cl. perfringens*)
 - 일반세균(균수 감소율 추이)
 - 대장균군
 - 대장균 : 제품별 상이
 - 진균류(효모, 곰팡이)
- 각 병원성 미생물에 대한 실험방법은 다음과 같음.
 - 기준 살균 조건의 설정 및 가열살균기의 설계함.
 - 가열살균기의 온도계와 공인기관에서 검·교정 받은 온도계를 이용하여 비교 검·교정함(온도 차를 확인 기록함).
 - 가열살균기의 온도를 기록하고 제품 품온은 온도계로 측정 기록함.
 - 가열살균기 통과 전 시료는 살균 전 검체로 사용하며 제품은 가열살균기를 통과하여 나온 제품을 살균 후 검체로 하였음.
 - 분석용 시료는 3개의 batch에서 각각 시료를 채취 검사하였음.

(다) 브로콜리 분말의 한계 기준 설정을 하기 위한 기준 살균조건의 설정 및 열풍건조기의 설계

- 현재 우리나라에서 이용되는 가열처리에 의한 살균 방법으로는 저온장시간 살균법(LTLT: Low Temperature Long Time, 63~65°C, 30 min), 고온단시간살균법(HTST: High Temperature Short Time, 72-75°C, 15-20 s) 및 초고온순간살균법(UHT: Ultra High Temperature, 130-150°C, 0.5-5 s) 등이 있음.
- 각 살균법에 의한 세균의 사멸률은 일반적으로 LTLT법은 97.3~99.9%, HTST법은 95.9~99.8%, UHT법은 99.99~100%라고 알려져 있으며, 산업적으로는 LTLT법은 냉장유통을 요하는 유제품 생산에 주로 사용되며, HTST법이나 UHT법은 냉장 또는 실온으로 유통되는 음료, 농

축액 제품들의 생산에 주로 이용되어짐.

- 그러나 상기 살균법에 의한 가열살균공정이라도 원료에서 유래하는 포자와 세균들을 완전히 제거할 수는 없어, 저장과 유통 중의 변패를 일으킬 수 있음이 지적되고 있음.
- 따라서 산업적으로는 pH, 당도 등 제품의 특징별로 이에 적합하도록 LTLT법, HTST법, 그리고 UHT법을 응용하여 가열살균설비를 설계하여 미생물의 효과적인 제어가 가능하도록 적용되어지고 있음. 이에 따라 국내 음료 제조사들에서는 90~131℃, 30~45 s 수준의 가열조건을 기준으로 살균설비를 제작하고 있음.
- 당사의 경우 주로 pH가 낮은 제품의 경우 HTST법을 응용하고 있고, 중성 제품의 경우 UHT법을 응용하고 있으며, 대부분의 음료업계에서 상온 유통용 고온충진 제품들에 적용하고 있는 살균 조건인 98℃, 30 s를 기준으로 하였으며, 초고온살균이 필요한 농축액 제품들은 121℃, 30 s를 기준으로 하였음. 이와 달리 열에 민감한 성분을 포함하는 제품의 경우 LTLT법을 응용한 65℃, 60 min을 기준 조건으로 하였음.
- 이와는 별개로 PEF(pulsed electric fields) 살균법의 경우 최근 ‘비가열공정(non-thermal processing)[펄스에너지(pulsed electric fields, PEF), 초고압(high hydrostatic pressure, HHP), 광펄스(intense pulse light, IPL), 초음파(ultrasonification), 비가열 플라즈마(non-thermal plasma, NTP), 고전압 아크 방전(high voltage arc discharge), 이온화 조사(ionizing radiation), 진동자기장(oscillating magnetic fields)] 등’ 중 하나로 최근에 산업화가 완성된 살균법임.
- PEF살균 기술의 기본 원리는 2개의 전극 사이에 대상물질을 위치시키고 전극 양단에 10 kV/cm 이상의 고전압을 가하여 순간적으로 방전시켜 전기장을 형성시킴으로써 미생물 세포 내외의 전위차(transmembrane potential)의 증가와 세포막의 압축을 통해 세포막이 파괴되고 구멍이 생기게 하여 살균을 하는 원리를 가짐.
- PEF 살균기술에 대한 국내외 연구결과들과 해외 산업계 적용 사례를 선행기술로 하여 출력(%)과 헤르츠(Hz) 조건 따른 식품에 가해지는 에너지(kJ/L)와 가해진 에너지에 의한 온도변화에 대해 80%, 200 Hz의 처리조건과 90 kJ/L, 60℃ 이상으로 모니터링 대상 기준을 선정하였음.
- 분말형태의 제품의 경우 살균법들이 한정되어 있음. UV, 마이크로웨이브, 감마선 등의 처리법이 있지만, 산업적으로는 열풍을 이용한 건열 살균법을 많이 활용하고 있음. 따라서 당사 공장에서 보유하고 있는 열풍건조기를 사용한 방법은 분말류 제품들의 살균에 있어 효율적으로 미생물 제어가 가능한 방법으로 적용할 수 있음. 예시로 곡류분말과 통곡물을 이용한 과자류 제품들의 경우 70℃이상의 열풍으로 12~48 h의 조건으로 가열 처리 시 log 3~4 수준의 일반미생물 저감 및 대장균을 음성으로 저해하는 공정의 경험을 가지고 있어 이를 분말류 제품의 살균 공정에 적용하는 기준으로 선정하였음.

(라) 브로콜리 분말의 한계 기준 설정을 하기 위한 제품 제조 시 열풍건조기 살균조건과 처리 결과

Table 43. 열풍건조기 설정조건(슈퍼콜리, 설정치 75℃, 24시간 이상)

| 구분 | 건조기 온도(℃) | 시간(hr) |
|----|-----------|--------|
| 1차 | 75 | 8 |
| 2차 | 75 | 12 |
| 3차 | 75 | 18 |
| 4차 | 75 | 24 |

Table 44. 열풍건조기를 이용한 살균 처리 전·후 결과

| 시료 1 | 항목 | 살균 전 | 살균 후 |
|--------------|-------------------------|--------------|----------|
| | 장출혈성 대장균 | 음성(-) | 음성(-) |
| | <i>L. monocytogenes</i> | 음성(-) | 음성(-) |
| | <i>Salmonella spp</i> | 음성(-) | 음성(-) |
| | <i>S. aureus</i> | 음성(-) | 음성(-) |
| | <i>B. cereus</i> | 음성(-) | 음성(-) |
| | <i>Cl. perfringens</i> | 음성(-) | 음성(-) |
| | 일반세균 | 33,000 CFU/g | 40 CFU/g |
| | 대장균군 | 0 CFU/g | 0 CFU/g |
| | 대장균(<i>E.coli</i>) | 음성(-) | 음성(-) |
| 진균류(효모, 곰팡이) | 280 CFU/g | 0 CFU/g | |

| 시료 2 | 항목 | 살균 전 | 살균 후 |
|--------------|-------------------------|--------------|----------|
| | 장출혈성 대장균 | 음성(-) | 음성(-) |
| | <i>L. monocytogenes</i> | 음성(-) | 음성(-) |
| | <i>Salmonella spp</i> | 음성(-) | 음성(-) |
| | <i>S. aureus</i> | 음성(-) | 음성(-) |
| | <i>B. cereus</i> | 음성(-) | 음성(-) |
| | <i>Cl. perfringens</i> | 음성(-) | 음성(-) |
| | 일반세균 | 55,000 CFU/g | 50 CFU/g |
| | 대장균군 | 0 CFU/g | 0 CFU/g |
| | 대장균(<i>E.coli</i>) | 음성(-) | 음성(-) |
| 진균류(효모, 곰팡이) | 220 CFU/g | 0 CFU/g | |

| 시료 3 | 항목 | 살균 전 | 살균 후 |
|-------------------------|----------|-------|-------|
| | 장출혈성 대장균 | 음성(-) | 음성(-) |
| <i>L. monocytogenes</i> | 음성(-) | 음성(-) | |

| | | | |
|--|------------------------|--------------|----------|
| | <i>Salmonella spp</i> | 음성(-) | 음성(-) |
| | <i>S. aureus</i> | 음성(-) | 음성(-) |
| | <i>B. cereus</i> | 음성(-) | 음성(-) |
| | <i>Cl. perfringens</i> | 음성(-) | 음성(-) |
| | 일반세균 | 28,000 CFU/g | 50 CFU/g |
| | 대장균군 | 0 CFU/g | 0 CFU/g |
| | 대장균(<i>E.coli</i>) | 음성(-) | 음성(-) |
| | 진균류(효모, 곰팡이) | 140 CFU/g | 0 CFU/g |

*상기 표들 중 병원성 미생물 6종의 결과는 공인분석기관에서의 분석 결과치 임.

- 75℃에서 열풍건조된 슈퍼콜리를 분말화한 후 살균 전·후 위해 병원성 미생물의 사멸 정도를 확인한 결과 병원성 미생물인 장출혈성 대장균, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Cl. perfringens*들은 살균 전·후 모두 음성으로 나타내었음.
- 대장균군, 대장균, 진균류은 살균 후 모두 식품의 유형별 규격 내로 감소하거나 음성으로 나타났으며, 섭취해 인체에 위해를 가할 수 있는 미생물들이 안전하게 제어됨을 확인할 수 있었음. 또한 일반세균은 살균 후 모두 식품의 유형별 규격 내로 감소하는 것으로 나타나 미생물이 안전하게 제어됨을 확인할 수 있었음.
- 동결건조기를 통해 건조된 브로콜리는 냉동된 상태로 동결건조가 수행됨에 따라 일반세균 및 대장균군 등과 같은 위해 미생물의 제어를 막지 못하였으며, 동결건조된 슈퍼콜리 분말을 이용할 경우 추가적으로 자외선 살균, 오존 살균과 같은 살균방법을 도입함으로써 관능적인 특성을 잃지 않는 상태에서 식품 안전성이 증가된 제품을 생산할 수 있을 것이라 판단됨.
- 75℃에서 열풍건조기를 통해 건조된 슈퍼콜리는 분말화를 거치기 전 고열의 온도에서 살균처리를 수행하지만, 동결건조기에 의해 건조된 슈퍼콜리와 비교하였을 때 sulforaphane의 함량이 다소 낮은편으로 열풍건조 시간이 단축된 상태로 살균처리 후 동결건조를 함으로서 sulforaphane의 함량을 유지할 뿐만 아니라 식품안전성을 증가시킬 수 있는 방법이라고 판단됨.
- 상기와 같은 결과를 볼 때 기능성이 향상된 브로콜리의 분말은 당사 살균 공정의 한계 기준을 설정 실험을 통해 열풍건조기를 활용하여 70~80℃, 24 h 이상 처리는 위해 미생물을 제어하기에 적합한 것으로 판단됨.

(마) 브로콜리 분말의 살균처리 조건에 따른 미생물 제어

Table 44. 살균처리 조건에 따른 미생물 제어 결과

(단위 : CFU/mL)

| 일반세균 | | | 대장균 | | |
|------|-------------|--------|-----|-------------|--------|
| 대조군 | 미산성수 전해수 처리 | 에탄올 처리 | 대조군 | 미산성수 전해수 처리 | 에탄올 처리 |
| 500 | 166 | 0 | 100 | 0 | 0 |

- 브로콜리 동결건조된 분말의 살균처리에 방법에 따른 미생물 제어 가능성을 평가하기 위하여 미산성수 전해수 및 70% 에탄올을 처리하여 분석함. 미산성수 전해수 및 70% 에탄올을 비교 분석하기 위하여 처리하지 않은 대조군과 비교 하였음.
- 그 결과 미산성수 전해수를 처리한 브로콜리 분말은 일반세균이 166 CFU/mL를 나타내었으나, 70% 에탄올 처리시 일반세균이 나타나지 않았음. 또한 대장균에서는 대조군에서 100 CFU/mL를 나타내었으나, 미산성수 또는 에탄올을 처리하였을 때 나타나지 않았음.

나. 표준화된 분석법을 통한 브로콜리 액기스의 물리, 화학적 품질 및 특성 평가

(1) 표준화된 분석법을 통한 브로콜리 액기스의 sulforaphane 안정성 평가

- 5 kW PEF을 이용해 액기스를 처리하기 위해서는 착즙액 약 30L를 필요로 하였기 때문에 PEF 처리되지 않은 브로콜리 및 PEF 처리된 브로콜리 원물을 각 100 Kg 사용하여 실험하였음.
- 당사의 보유기술 중 하나인 PEF는 기능성분인 sulforaphane을 증폭시킬 뿐만 아니라 비가열살균처리 공정으로 적용이 가능함. 다양한 식품에서 열을 가해 미생물을 제어하는 방법이 사용되지만, 영양성분 및 관능적인 특성이 손실되어 식품가공 안전성이 증가되는 반면 영양학적 가치는 감소함. 이에 PEF 처리를 통해 살균처리를 하고자 하였음.
- 브로콜리 착즙액의 PEF 비가열살균은 0.2 S/m 이상의 전기전도도에 의해 살균공정이 이루어지도록 하였으며, 유속은 약 100 L/h로 순환시켜 착즙액 모든 부분이 PEF 처리가 되도록 하였음. 또한 PEF 기기 내 처리 설정조건은 specific energy 100 kJ/L, pulse width 24~30 μ s, outvoltage 50~80%, frequency 90~300 Hz 설정, 추가적으로 주입온도를 50 $^{\circ}$ C로 설정 후 처리하였음.

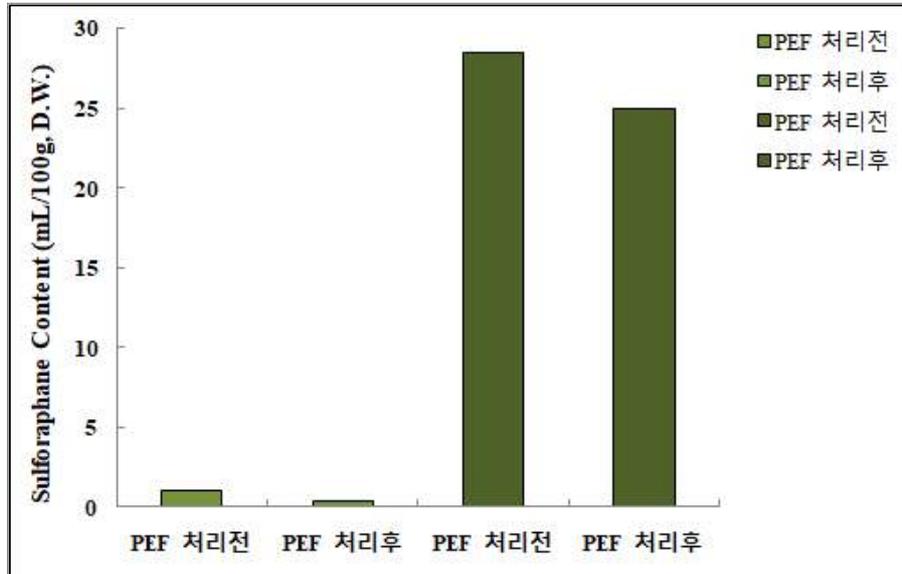


Fig 76. PEF 살균처리에 따른 sulforaphane 안정성 평가

- PEF 처리된 브로콜리 액기스가 PEF 살균처리에 의해 sulforaphane 함량에 어떠한 영향을 미치는지 확인하고자 하였음.
- PEF 처리되지 않은 브로콜리 액기스의 경우 1.04 mL/100g(D.W.)를 보였으며 PEF 살균 처리후 0.36 mL/100g(D.W.)의 sulforaphane 함량을 나타내었음. 또한 sulforaphane 증폭을 위해 PEF 처리된 브로콜리 착증액은 28.48 mL/100g(D.W.)을 보였으며, PEF 살균처리 후 24.94 mL/100g(D.W.)를 나타내었음.
- PEF 전기장 증가에 의해 sulforaphane 함량에 미약한 영향을 미쳐 sulforaphane 함량이 감소하였으나, 병원성 미생물 및 일반세균 등을 제어하기 위한 식품안전성을 증가시키기 위해서는 PEF 전기장 처리를 통한 살균처리가 적합할 것으로 판단됨. Sulforaphane의 경우 60℃ 이상의 온도에서 sulforaphane이 손실되기 때문에 당사가 보유하고 있는 PEF 기술을 다양하게 적용하여, 가열을 통한 영양소 손실 및 관능적인 특성, 기능성소재 손실을 방지하는데 적합함.

(2) 표준화된 분석법을 통한 브로콜리 액기스의 미생물 제어 평가

- FDS, 55DS, 그리고 75DS의 건조방법에 따라 SG, OA, 그리고 SG+OA를 넣어 실험군을 달리하여 실험하였음. 모든 실험군은 진공포장지에 포장 후 진공한 상태로 상온에서 보관되었음.
- 각 FDS, 55DS, 그리고 75DS는 멸균된 0.1%(w/w) 펩톤수에 10배수로 1차 희석되었으며, 희석된 FDS, 55DS, 그리고 75DS는 stomacher(W5-400, (주)세니원이엔티) 균질화 하였음. 일반세균 및 대장균군은 페트리필름(3M Petri film™, St. Poul, MN, USA)에 각각 분주하였음. 분주된 일반세균 및 대장균군 페트리필름은 37℃에서 2 day 동안 배양하였음.

Table 45. PEF 처리된 브로콜리의 생물학적 안전성 평가

(단위 : log CFU/mL)

| 구분 | Broccoli | | Superccoli | |
|-----------|----------|------|------------|------|
| | 일반세균 | 대장균군 | 일반세균 | 대장균군 |
| 브로콜리 입고 후 | 6.27 | 4.37 | 6.27 | 4.37 |
| 미산성수 처리 후 | 5.44 | 3.73 | 5.44 | 3.73 |
| PEF 처리 후 | - | - | 5.40 | 3.69 |
| 착즙 후 | 5.04 | 3.64 | 5.38 | 3.67 |
| PEF 살균 후 | 4.80 | 3.62 | 5.00 | 3.64 |

- PEF 처리된 브로콜리의 생물학적 안전성을 평가하기 위하여 착즙액 공정과정에 따른 일반세균 및 대장균군 검사를 실시하였음. 브로콜리 입고시 6.27 log CFU/mL를 나타내었음. 미산성수 처리 후 0.83 log CFU/mL가 줄었으며, PEF 살균 처리 과정에서는 5.0 log CFU/mL까지 줄어드는 것을 확인하였음.
- PEF 처리된 브로콜리 액기스가 식품학적으로 안전성을 나타내기에는 1.0 log CFU/mL까지 줄어들어야 되나 PEF 처리시 전기장 영향을 단시간 적용되어 미생물을 제어하기 위한 시간이 충분하지 않았음을 판단하였음. 이에 추후 실험에서는 PEF 처리된 브로콜리 액기스가 PEF 처리 시간을 증가시켜 처리하고자 하였음.
- 브로콜리 착즙액의 PEF 비가열살균은 0.2 S/m 이상의 전기전도도에 의해 살균공정이 이루어지도록 하였으며, 유속은 약 100 L/h로 순환시켜 착즙액 모든 부분이 PEF 처리가 되도록 하였음. 또한 PEF 기기 내 처리 설정조건은 specific energy 100 kJ/L, pulse width 24~30 μ s, outvoltage 50~80%, frequency 90~300 Hz 설정, 추가적으로 주입온도를 50°C로 설정 후 처리하였으며, 4 cycle이 되도록 전기장 처리시간을 증가시켰음.
- 그 결과 원물에서는 일반세균과 대장균군은 5.7과 1.95 log CFU/mL를 보였으나, PEF 살균처리시 PEF 처리하지 않은 군에서 일반세균과 대장균군은 3.7과 1.66 log CFU/mL를 나타내었으며, PEF 처리된 브로콜리는 일반세균과 대장균군은 2.8과 2.13 log CFU/mL의 결과를 보였음.
- 종합하자면 액기스 처리시 sulforaphane을 증가시키기 위한 전기장 세기보다 PEF 기술에 전기장을 증가시키고, 전기장을 받는 시간을 증가시킨다면 일반세균 및 대장균군을 성장을 제어할 수 있는 결과를 보임.

Table 45. PEF 처리된 브로콜리 액기스의 PEF 살균처리에 의한 생물학적 안전성 평가

(단위 : log CFU/mL)

| 구분 | Broccoli | | Superccoli | |
|----------|----------|------|------------|------|
| | 일반세균 | 대장균군 | 일반세균 | 대장균군 |
| 원물 | 5.72 | 1.95 | - | - |
| PEF 살균 후 | 3.70 | 1.66 | 2.80 | 2.13 |

(3) 표준화된 분석법을 통한 브로콜리 액기스의 품질 규격 가이드 설정

- PEF 처리된 브로콜리 액기스의 품질 규격을 설정하기 위하여, 원물 입고시 브로콜리 내 이물 및 잔류농약 등을 세척과 미산성수를 이용하여 1차적으로 제어함. 이후 PEF의 전기장을 증가시켜 미생물을 제어하기 위해 유속은 약 100 L/h로 순환시켜 착즙액 모든 부분이 PEF 처리가 되도록 하였음. 또한 PEF 기기 내 처리 설정조건은 specific energy 100 kJ/L, pulse width 24~30 μ s, outvoltage 50~80%, frequency 90~300 Hz 설정, 초기주입온도 50 $^{\circ}$ C로 하여 처리하는 것을 정하고자 함.

다. 표준화된 분석법을 통한 브로콜리 푸레의 물리, 화학적 품질 및 특성 평가

(1) 표준화된 분석법을 통한 브로콜리 푸레의 수분함량, Brix, 그리고, pH 특성 평가

- 브로콜리 및 슈퍼콜리 푸레를 제조하기 위하여 01월 달에 어랑진 영농조합으로부터 얻은 제주시 한림읍 지역에서 재배된 브로콜리를 이용하였음. 제공 받은 브로콜리는 약 100 kg임.
- 브로콜리를 손질하기 이전에 입고된 브로콜리의 이물을 제거하기 위하여 세척한 후 초기미생물 제어를 위해 미산성수를 이용해 살균하였음. 브로콜리 내 glucoraphanin를 myrosinase 효소작용을 통해 기능성분인 sulforaphane을 증폭시키기 위하여 30 kW PEF 기기를 사용하였음. 전기장 처리를 위해 PEF 기기 설정은 specific energy 7 kJ, frequency 90~100 Hz, 그리고 belt speed 1.0으로 맞추어 진행하였음. Belt chamber를 통해 PEF 처리된 브로콜리는 2 h 동안 상온에서 효소반응을 유도한 후 믹서기를 이용하여 푸레를 제조하였음.

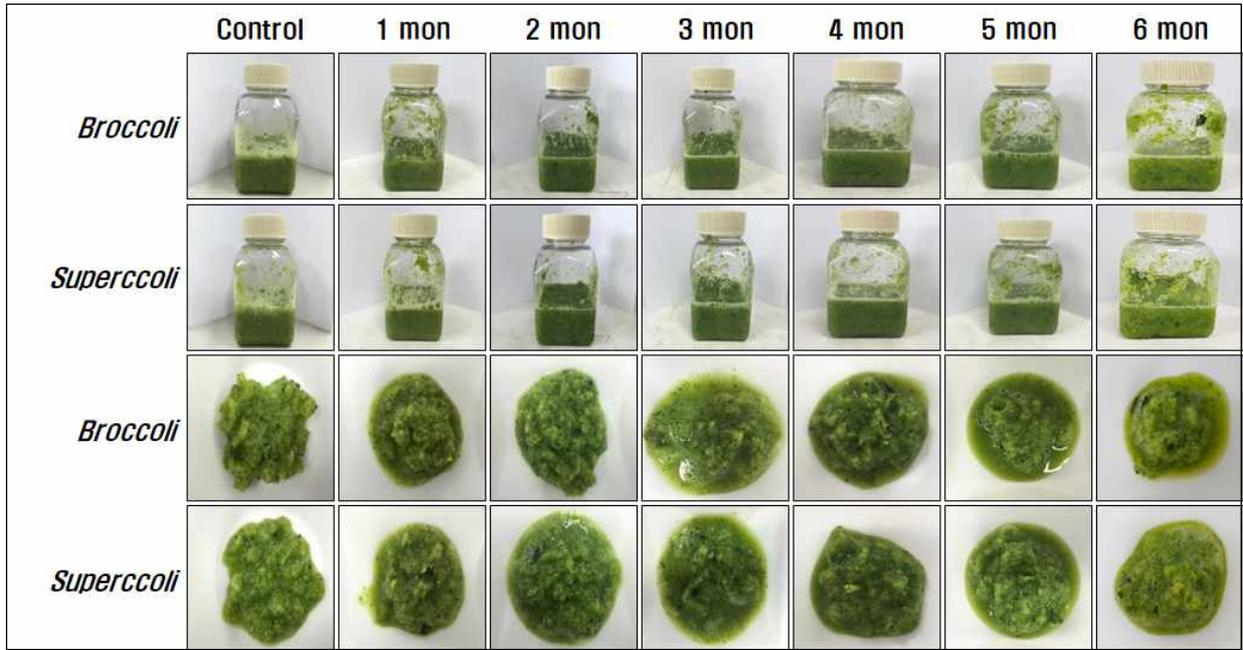


Fig 77. 브로콜리 및 슈퍼콜리 퓨레의 특성 변화

- 제조된 퓨레는 500 mL 샘플병에 250 mL씩 주입한 후 -20°C 냉동상태에서 유지하였으며, 실험을 위해 각 그룹당 하나씩 사용하여 분석하였음. 샘플병에 담겨있는 브로콜리 및 슈퍼콜리 퓨레는 관능적 특성 및 황화작용에 영향을 미치는지 평가하기 위하여 수분함량, Brix, 그리고 pH를 측정함으로써 퓨레의 제품 사용가능성을 평가하고자 하였음.

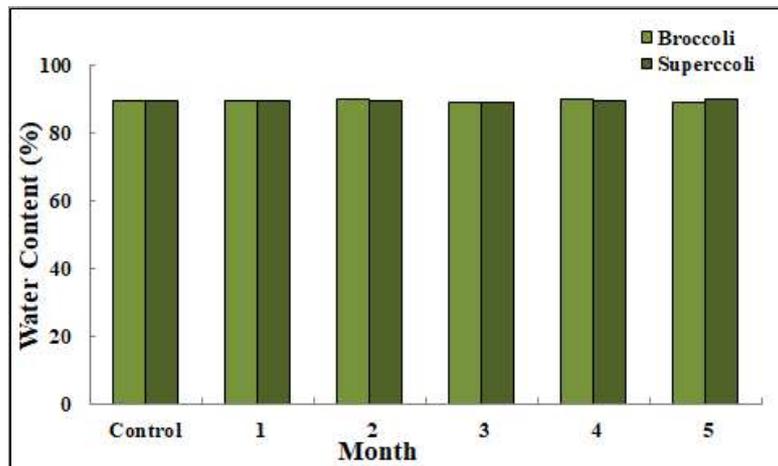


Fig 78. 브로콜리 및 슈퍼콜리 퓨레의 수분함량 변화 평가

- 브로콜리 및 슈퍼콜리 퓨레의 수분함량은 수분측정기(MOC63U, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 브로콜리와 슈퍼콜리 퓨레는 5달 동안 평가되었음. 대조군에서는 브로콜리와 슈퍼콜리의 수분함량은 89.50%와 89.40%로 유사한 수분함량을 나타내었음. 게다가 브로콜리는 1, 2, 3, 4, 그리고 5 mon에서는 89.31%, 89.91%, 88.64%, 89.58%, 그리고 88.76%의 수분함량을 나타내었으며, 슈퍼콜리는 1, 2, 3, 4, 그리고 5 mon에서 89.48%, 89.26%, 88.92%, 89.41%, 그

리고 89.59%의 수분함량을 나타내었음. 브로콜리와 슈퍼콜리 푸레의 수분함량을 비교하자면 5 mon 동안의 냉동 보관에는 수분함량에 영향을 미치지 않는 것을 나타내었음.

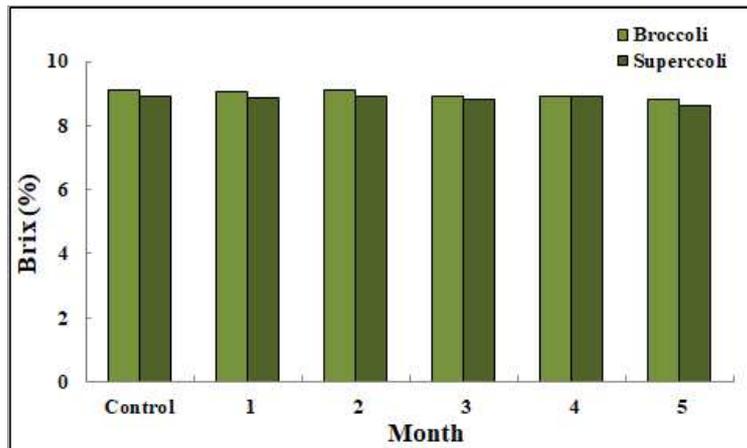


Fig 79. 브로콜리 및 슈퍼콜리 푸레의 Brix 변화 평가

- 브로콜리 및 슈퍼콜리 푸레의 Brix는 굴절식당도 측정기(Abbemat200, Anton-paar, Innsbruck, Austria)를 이용하여 측정하였으며, 5 mon 동안의 냉동보관을 통해 브로콜리 및 슈퍼콜리 푸레의 Brix에 미치는 영향을 평가하였음. 브로콜리와 슈퍼콜리의 대조군은 9.1와 8.9 Brix를 나타내었음. 저장기간인 1, 2, 3, 4, 그리고 5 mon 동안의 브로콜리 푸레는 9.1, 9.1, 8.9, 8.9, 그리고 8.8 Brix를 보였으며, 슈퍼콜리 푸레는 8.9, 8.9, 8.8, 8.9, 그리고 8.6 Brix를 나타내었음. 냉동상태 보관 기간 동안에는 Brix에 영향을 미치지 않았음.

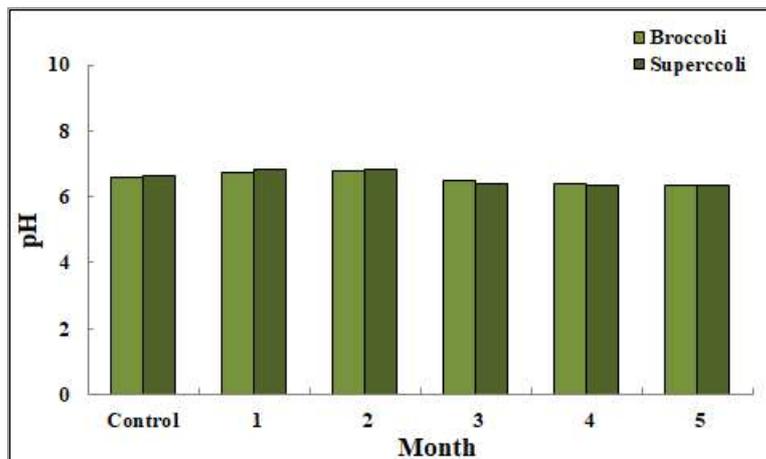


Fig 80. 브로콜리 및 슈퍼콜리 푸레의 pH 변화 평가

- 브로콜리 및 슈퍼콜리 푸레의 pH는 pH meter (1232105370, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland)를 이용하여 측정하였음. 대조군에서는 브로콜리와 슈퍼콜리의 pH는 6.61와 6.66로 유사한 pH를 나타내었음. 게다가 브로콜리는 1, 2, 3, 4, 그리고 5 mon에서는 6.74, 6.76, 6.49, 6.38, 그리고 6.36의 pH를 보였으며, 슈퍼콜리는 1, 2, 3, 4, 그리고 5 mon에서 6.81, 6.83, 6.39,

6.36, 그리고 6.36 pH를 나타내었음. 브로콜리와 슈퍼콜리 푸레의 pH를 비교하자면 5 mon 동안의 냉동 보관에는 영향을 미치지 않는 것을 나타내었음.

(2) 표준화된 분석법을 통한 브로콜리 푸레의 색차 특성 평가

- 브로콜리와 슈퍼콜리 푸레 제작을 통한 냉동상태에서 보관이 푸레 색차에 영향을 미치는지 확인하고자 하였음. 앞의 실험방법과 동일하게 브로콜리와 슈퍼콜리를 믹서기로 간 후 500 mL 샘플 병에 250 mL씩 주입한 후 -20°C 냉동상태에서 유지하였음. 1 mon 간격으로 분석을 실시하였음.
- 색차 측정은 Konicaminolta/CM-5 측정기기를 이용하여 명도(L*), 적색도(a*), 황색도(b*)를 측정하였음.
- 브로콜리와 슈퍼콜리 푸레를 색차를 측정하였을 경우 브로콜리 대조군에서는 L, a, 그리고 b의 값은 15.03, -6.35, 그리고 25.15의 값을 나타내었으며, 슈퍼콜리 대조군은 12.93, -6.35, 그리고 25.15의 값을 나타내었음. 이후 브로콜리의 1, 2, 3, 4, 그리고 5 mon에서는 L(20.03, 21.00, 17.01, 25.43, 그리고 19.13), a(-5.75, -5.6, -5.5, -5.34, 그리고 -5.06), b(33.57, 35.19, 28.58, 42.28, 그리고 32.10)을 보였으며, 브로콜리의 1, 2, 3, 4, 그리고 5 mon에서는 L(16.67, 17.65, 17.26, 18.26, 그리고 19.76), a(-5.92, -5.83, -5.36, -5.79, 그리고 -5.02), b(26.82, 29.67, 28.99, 30.69, 그리고 33.11)을 나타내었음.
- 종합하자면 냉동 보관된 브로콜리 및 슈퍼콜리 푸레는 5 mon까지 수분함량, Brix, pH, 그리고 색차에서 보관전 상태와 유사한 상태를 보임으로서 슈퍼콜리 푸레를 이용한 제품생산시 관능적인 특성을 손실하지 않은 상태에서 온전히 사용할 수 있음을 보이는 바임.

Table 46. 브로콜리 및 슈퍼콜리 푸레의 색차 평가

| 구분 | Broccoli | | | Superccoli | | |
|---------|----------|-------|-------|------------|-------|-------|
| | L | a | b | L | a | b |
| Control | 15.03 | -6.35 | 25.15 | 12.93 | -6.17 | 21.68 |
| 1 mon | 20.03 | -5.75 | 33.57 | 16.67 | -5.92 | 26.82 |
| 2 mon | 21.00 | -5.6 | 35.19 | 17.65 | -5.83 | 29.67 |
| 3 mon | 17.01 | -5.5 | 28.58 | 17.26 | -5.36 | 28.99 |
| 4 mon | 25.43 | -5.34 | 42.28 | 18.26 | -5.79 | 30.69 |
| 5 mon | 19.13 | -5.06 | 32.10 | 19.76 | -5.02 | 33.11 |

(3) 표준화된 분석법을 통한 브로콜리 퓨레의 품질 규격 가이드 설정

- PEF 처리 기술을 활용한 브로콜리 내 sulforaphane 함량 증가를 통한 기능성 식품소재 개발을 산업적으로 이용하기 위하여 식품 형태 중 하나인 퓨레를 이용한 기술에 대한 규격을 설정하기 위하여 pH, 수분함량, Brix 및 관능적 특성을 테스트함으로써 퓨레의 규격을 설정하고자 하였음.
- 또한 제주공장 내 설비 기술을 활용해 PEF 처리된 브로콜리의 최적 공정을 설정하고자 하였음.



Fig 81. PEF 처리된 브로콜리 퓨레의 제조공정도

- PEF 처리된 브로콜리의 퓨레를 만들기 위한 제조공정은 위와 같음. 주원료(브로콜리) 입고 후 1차 세척, 미산성수 살균을 통해 이물을 제거하고 미생물을 제어함. 이후 30 kW PEF 기기를 사용하여 전기장 처리를 위해 specific energy 7 kJ, frequency 90~100 Hz, 그리고 belt speed 1.0으로 설정하여 진행함. Belt chamber를 통해 PEF 처리된 브로콜리는 2 h 동안 상온에서 효소반응을 유도한 후 미파쇄기(한청분쇄기계)를 이용하여 퓨레 형태를 생산함. 이후 보관을 위해 스파우트파우치에 포장하였으며, 냉각 후 냉동보관함.

7. PEF 처리 브로콜리의 농산가공 소재로의 산업화를 위한 포장 및 저장법 개발

가. 농산가공 소재로의 PEF 처리 브로콜리의 물리, 화학적 품질 및 특성 평가

(1) 농산가공 소재로의 PEF 처리 브로콜리의 sulforaphane 안정성 평가

- 본 실험을 실시하기 위하여 위탁기관인 어량진 영농조합법인에서 제공하는 브로콜리를 기준으로 실시하였음. 제공받은 브로콜리는 SK3-085종을 사용하였으며, 12~01월 달에 제주시 한림읍 지역에서 재배된 브로콜리를 이용하였음.
- 입고된 브로콜리의 이물을 제거하기 위하여 세척한 후 초기미생물 제어를 위해 미산성수를 이용해 살균하였음. 브로콜리 내 glucoraphanin를 myrosinase 효소작용을 통해 기능성분인 sulforaphane을 증폭시키기 위하여 30 kW PEF 기기를 사용하였음. 전기장 처리를 위해 PEF 기기 설정은 specific energy 7 kJ, frequency 90~100 Hz, 그리고 belt speed 1.0으로 맞추어 진행하였음. Belt chamber를 통해 PEF 처리된 브로콜리는 2 h 동안 상온에서 효소반응을 유도한 후 0~4℃ 사이의 냉장 조건에서 포장되어지지 않은 상태에서 보관되었음.
- 우선적으로 슈퍼콜리의 냉장온도 조건에서 외관 및 황화현상이 일어나는지 평가하기 위하여 실험하였음. 슈퍼콜리 실험 대조군으로 같은 종의 세척된 일반 브로콜리를 사용하였음. 실험은 14 day 동안 실시하였음.

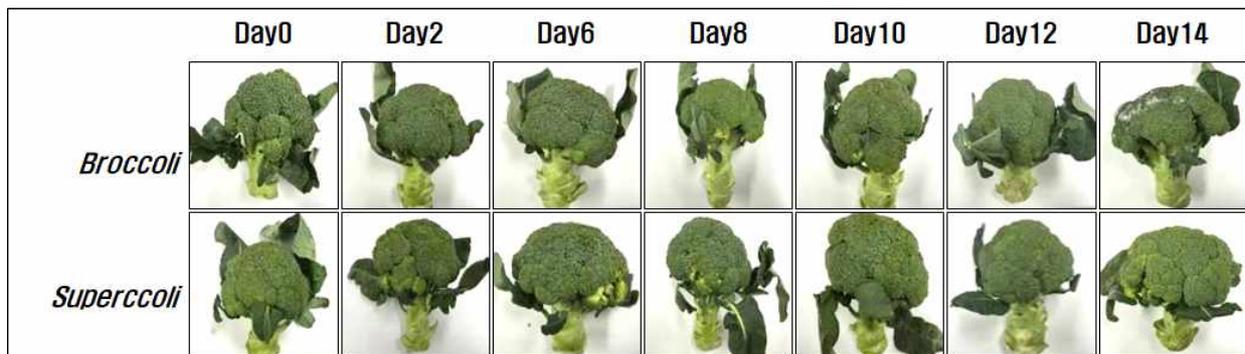


Fig 82. 브로콜리 및 슈퍼콜리의 외형적 특성 분석 및 수분함유량 평가

- 그 결과 대조군 대비 외형적인 변화는 없었으나 Day12 이후 브로콜리는 화퇴 부분에 곰팡이가 발생하는 것을 확인하였음. 또한 슈퍼콜리는 Day12 이후 브로콜리 겉표면이 건조되는 것을 확인하였음. 수분함량을 측정된 결과 브로콜리는 Day0, 2, 6, 8, 10, 12, 그리고 14에서는 88.51, 87.61, 85.87, 83.44, 85.49, 84.83, 그리고 87.87%을 보여 대조군 대비 약 4%가 감소하였으며, 슈퍼콜리는 88.24, 86.38, 86.26, 84.96, 86.63, 85.19, 그리고 84.62%를 나타내어 대조군대비 4%가 감소하여 브로콜리와 유사한 수분함량을 나타내었음.
- 브로콜리에 PEF를 처리하였을 경우 세포벽에 구멍이 생김으로서 glucoraphanin이 나와

myrosinase을 만남으로서 sulforaphane이 생성됨. 그와 동시에 세포질에 있던 수분도 함께 용출됨으로서 수분이 외부로 손실되거나 증발함으로서 Day 12 이후 슈퍼콜리 표면의 수분함량이 감소함으로서 겉표면이 건조하게 되었음을 확인하였음.

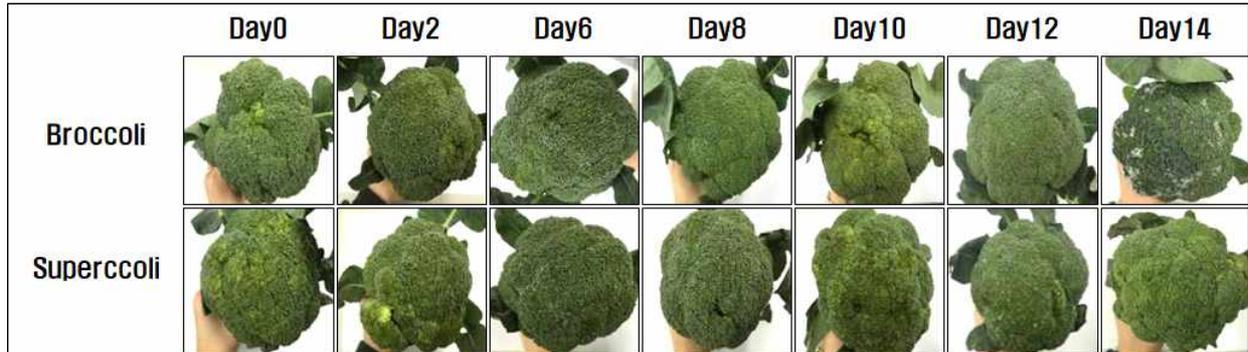


Fig 83. 브로콜리 및 슈퍼콜리 꽃(화퇴)의 황화현상 평가

- 브로콜리 섭취시 대부분은 딱딱한 식감을 가지는 가지 부분보다 꽃(화퇴) 부분을 많이 섭취하며, 기능성 성분인 sulforaphane 및 glucoraphanin이 꽃(화퇴)에 많이 분포되어 있음. PEF 처리에 의해 브로콜리의 꽃 부분에 황화현상에 영향을 미치는지 확인하고자 하였음.
- 황화현상의 경우 식물체 내 철과 마그네슘의 결핍에 의해 일어나는 경우로, 본 실험에서 PEF 처리가 황화현상을 유도할 수 있는지 평가하였음. 대조군인 브로콜리의 경우 황화현상이 일어나지 않았으며, 게다가 슈퍼콜리에서도 꽃 부분에 황화현상이 일으키지 않았음.
- 종합하자면 PEF 처리된 브로콜리를 냉장 조건에서 저장할 경우 겉표면에 대한 건조현상일 일어나는 데 따라 수분손실을 줄일 수 있는 실험을 필요로 하였음. 이후 실험에서는 수분증발을 줄이고 산소 접촉을 최소화할 수 있는 진공포장지에 대해 PEF 처리된 브로콜리에 어떠한 영향을 미치는지 알아보하고자 하였음.

(2) 농산가공 소재로의 PEF 처리 간편 브로콜리의 포장 조건 설정

- 이전 실험에서는 0~4℃ 사이의 냉장 조건에서 포장되어지지 않은 슈퍼콜리의 겉표면 수분손실을 방지하기 위하여 당사의 진공포장기를 이용하여 진공포장지에 보관하였음. 또한 간편 슈퍼콜리 형태의 보관 가능성을 확인하고자 하였음.
- 입고된 브로콜리의 이물을 제거하기 위하여 세척한 후 초기미생물 제어를 위해 미산성수를 이용해 살균하였음. 브로콜리 내 glucoraphanin를 myrosinase 효소작용을 통해 기능성분인 sulforaphane을 증폭시키기 위하여 30 kW PEF 기기를 사용하였음. 전기장 처리를 위해 PEF 기기 설정은 specific energy 7 kJ, frequency 90~100 Hz, 그리고 belt speed 1.0으로 맞추어 진행하였음. Belt chamber를 통해 PEF 처리된 브로콜리는 2 h 동안 상온에서 효소반응을 유도한 후

0~4℃ 사이의 냉장 조건에서 진공포장 상태에서 보관되었음.

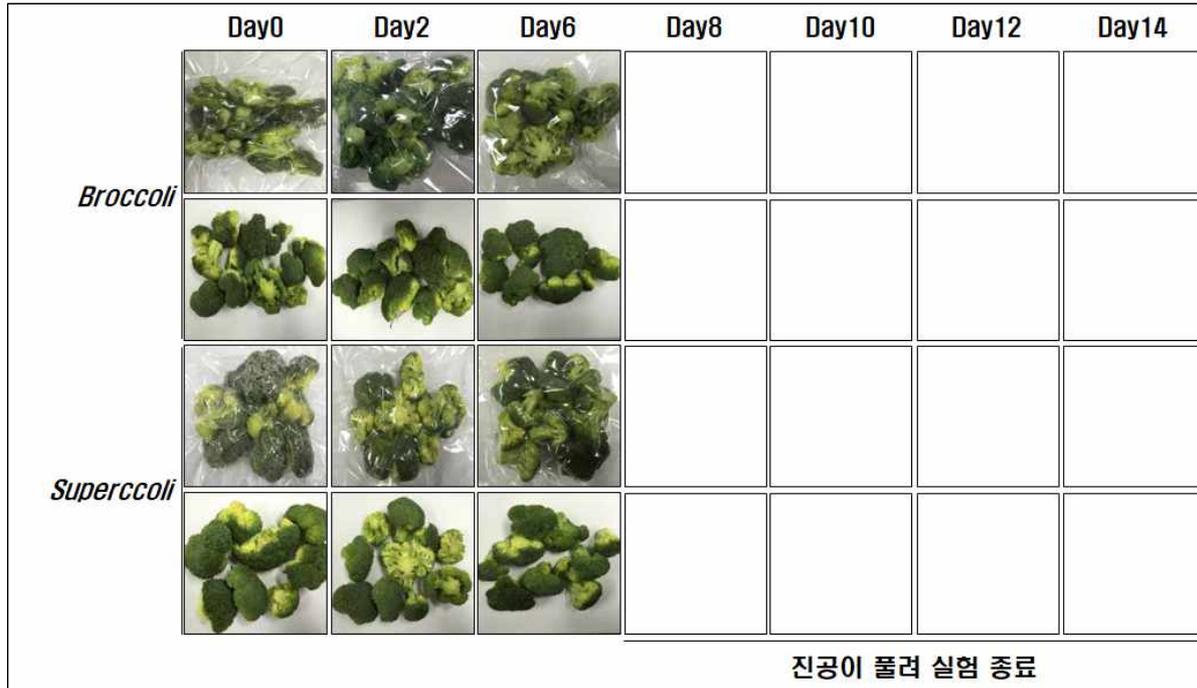


Fig 84. PEF 처리된 간편 브로콜리의 진공포장에 따른 형태 변화

- 진공포장된 간편 브로콜리 및 슈퍼콜리는 냉장상태에서 보관 되었으며, 실험은 Day0, 2, 6, 8, 10, 12, 그리고 14에 진행되었음. Day 0와 비교하였을 때 Day6까지 곰팡이가 발생하지 않았으며, 포장지 내 진공도도 유지되었음. 그러나 Day 6 이후 진공이 풀려 포장지 내 브로콜리가 고정되지 못하는 현상이 발생함. 또한 Day 6일 이후 악취로 발생함에 따라 섭취가 불가능하였음.
- 이후 간편 브로콜리 손질에 따라 진공도에 영향을 미치는 결과를 확인해본 바 포장형태에 따른 PEF 처리된 브로콜리에 영향을 미치는지 확인하고자 하였음. PEF 처리된 브로콜리 포장지에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 천공비닐, 진공비닐 및 은박진공비닐을 사용하여 분석하였음. PEF 처리된 브로콜리의 포장형태에 따라 분석할 뿐만 아니라 냉장과 상온(25℃)에서 보관한 후 평가하였음. 실험을 위하여 어랑진 영농조합법인에서 제공 받은 브로콜리 약 200 Kg으로 실험을 진행하였음.
- 상온상태에서 천공비닐, 진공비닐, 그리고 은박진공비닐로 보관된 슈퍼콜리는 Day2에서부터 황화현상이 일어났으며, 악취를 나타내었음. 게다가 Day7까지 더욱 심해졌으며, 일부는 슈퍼콜리에서 수분이 빠져나오기도 하였음. 천공비닐에 보관된 슈퍼콜리의 경우 외부공기와 접촉을 하여 Day5 이후 곰팡이가 발생하기도 하였음. 이는 상온상태에서 보관된 슈퍼콜리는 온도의 영향에 따라 부패가 발생 하였으며, 추후 슈퍼콜리 산업화할 경우 제외할 것으로 보임.

- 냉장상태에서 천공비닐, 진공비닐, 그리고 은박진공비닐로 보관된 슈퍼콜리는 이전 실험과 동일하게 Day5 전에는 외관상 및 악취가 발생하지 않았음. Day7 이후 천공비닐과 함께 냉장상태에서 보관된 슈퍼콜리는 Day 9 이후 겉표면의 수분함량이 감소하였으며, 식용 불가능한 상태를 나타내었음. 진공비닐 및 은박진공비닐에 보관된 슈퍼콜리는 Day9 이후 악취가 발생하기 시작하였음.

Table 47. PEF 처리된 브로콜리의 저장형태에 따른 형태 관찰

| Day | 브로콜리 및 슈퍼콜리 형태 변화 | | | | | | | | | | |
|------|-------------------|------|--------|--|------|------|--------|--|------|------|--------|
| Ctrl | 상온 | | | | | | 냉장 | | | | |
| | 천공비닐 | 진공비닐 | 은박진공비닐 | | 천공비닐 | 진공비닐 | 은박진공비닐 | | 천공비닐 | 진공비닐 | 은박진공비닐 |
| 2 | 브로콜리 | | | | 브로콜리 | | | | | | |
| | 슈퍼콜리 | | | | 슈퍼콜리 | | | | | | |
| 5 | 브로콜리 | | | | 브로콜리 | | | | | | |
| | 슈퍼콜리 | | | | 슈퍼콜리 | | | | | | |
| 7 | 브로콜리 | | | | 브로콜리 | | | | | | |
| | 슈퍼콜리 | | | | 슈퍼콜리 | | | | | | |
| 9 | | | | | 브로콜리 | | | | | | |
| | | | | | 슈퍼콜리 | | | | | | |
| 12 | | | | | 브로콜리 | | | | | | |
| | | | | | 슈퍼콜리 | | | | | | |

| | | 냉장 | | |
|----|------|---|--|--|
| | | 천공비닐 | 진공비닐 | 은박진공비닐 |
| 14 | 브로콜리 |  |  |  |
| | 슈퍼콜리 |  |  |  |
| | | 냉장 | | |
| | | 천공비닐 | 진공비닐 | 은박진공비닐 |
| 16 | 브로콜리 |  |  |  |
| | 슈퍼콜리 |  |  |  |
| | | 냉장 | | |
| | | 천공비닐 | 진공비닐 | 은박진공비닐 |
| 19 | 브로콜리 |  |  |  |
| | 슈퍼콜리 |  |  |  |

(3) 농산가공 소재로의 PEF 처리 간편 브로콜리의 sulforaphane 안정성 평가

- 입고된 브로콜리의 이물을 제거하기 위하여 세척한 후 초기미생물 제어를 위해 미산성수를 이용해 살균하였음. 브로콜리 내 glucoraphanin를 myrosinase 효소작용을 통해 기능성분인 sulforaphane을 증폭시키기 위하여 30 kW PEF 기기를 사용하였음. 전기장 처리를 위해 PEF 기기 설정은 specific energy 7 kJ, frequency 90~100 Hz, 그리고 belt speed 1.0으로 맞추어 진행하였음. Belt chamber를 통해 PEF 처리된 브로콜리는 2 h 동안 상온에서 효소반응을 유도하였음.
- 균질화된 브로콜리는 20g을 분리한 후 75% methanol의 20배수에서 3 h 동안 교반하였음. 이후 교반된 추출물은 filter paper (No. 4, GE healthcare, Maidstone, England)를 이용하여 부유물 및 침전물과 분리하였음.
- Glucoraphanin과 sulforaphane은 C18 column (250 × 4.6 mm; particle size, 3 μm; Phenomenex, USA)을 사용하여 분리하였음. Injector는 20 μL sample loop로 사용되었음. Acetonitrile / H₂O (20/80, v/v)를 유속 0.5 mL/min 이동상으로 하여 sulforaphane의 HPLC 분리를 수행 하였으며, 검출은 파장 235 nm에서 실시하였음. 증류수를 사용하기 전에 진공필터여과(HA-0.45 μm, Millipore, Waters, USA)를 통해 여과하였음.

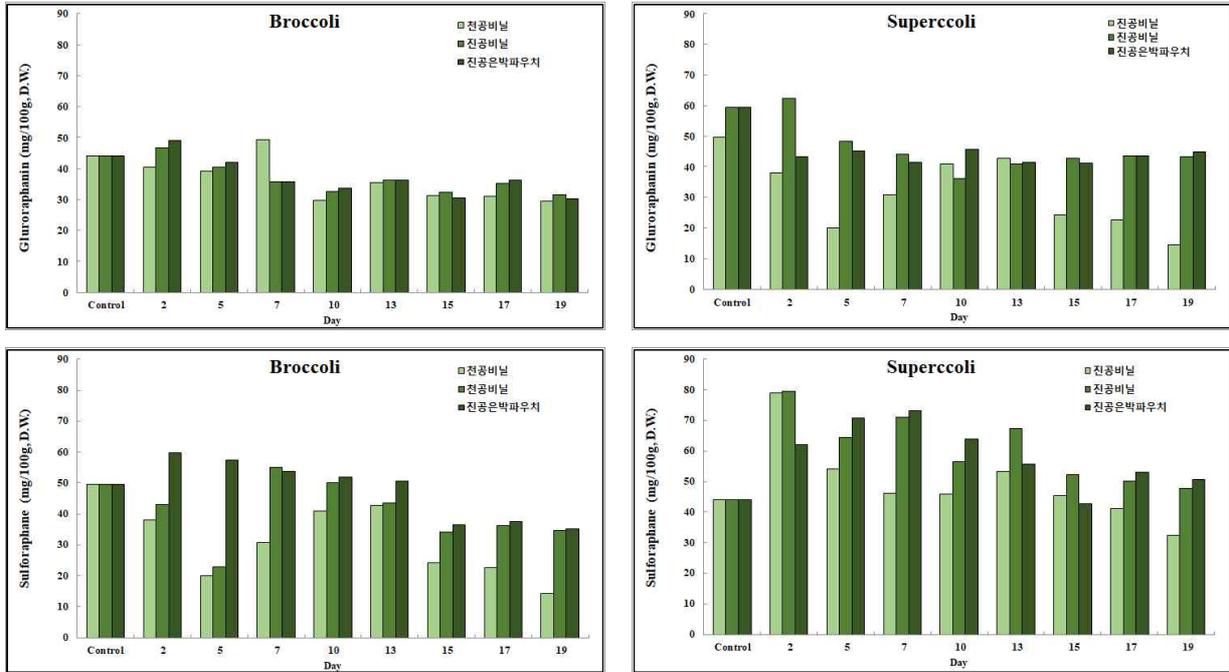


Fig 85. 포장형태에 따른 PEF 처리된 브로콜리의 glucoraphanin과 sulforaphane 함량 변화

- PEF 처리된 간편처리 브로콜리 내 포장형태에 따른 저장성 실험기간 동안 냉장상태에서 보관된 것을 이용하여 glucoraphanin과 sulforaphane 함량에 미치는 영향을 확인하고자 하였음. 실험군은 천공비닐, 진공비닐, 진공은박파우치의 3개군임.
- PEF 처리되지 않은 브로콜리의 천공비닐, 진공비닐, 그리고 진공은박파우치는 대조군 대비 glucoraphanin의 함량이 Day19에 66.94%, 71.75%, 그리고 68.80% 수준으로 감소하였으며, sulforaphane는 28.93%, 70.10%, 그리고 70.73%를 보였음.
- PEF 처리된 브로콜리의 천공비닐, 진공비닐, 그리고 진공은박파우치는 대조군 대비 glucoraphanin의 함량이 Day19에 64.81%, 73.06%, 그리고 75.62%를 보였으며, sulforaphane은 73.29%, 108.51%, 115.01%를 나타내었음.
- PEF 처리되지 않거나 처리된 브로콜리를 비교하였을 때 glucoraphanin의 함량은 Day19까지 시간의존적으로 유사하게 줄어들었으나 65% 이상의 수준을 유지하였음. Sulforaphane의 함량은 PEF 처리되지 않은 브로콜리의 천공비닐은 28.93%의 낮은 수준을 유지하였으나 산소접촉이 되지 않은 진공비닐과 진공은박파우치는 70%의 수준을 유지함. PEF 처리된 브로콜리의 천공비닐은 73.29%를 보였으며, 진공비닐 및 진공은박파우치는 100%의 수준을 나타내어 sulforaphane 함량에 영향을 미치지 않아 산소접촉을 차단하고 냉장상태를 유지하였을 경우 sulforaphane 안정성을 유지할 수 있다고 보였음.

나. PEF 처리 브로콜리의 농산가공 소재로의 품질 규격 가이드 설정

| BK bio The green innovator | | 제 품 설 명 서 | | 문서번호 | BKHF-100-03 | |
|-------------------------------|--------------------|--|-------|------|----------------|----------------|
| | | 슈퍼콜리 | | 제정일자 | 2016.07.01 | |
| | | | | 개정일자 | 2017.01.02 | |
| | | | | 개정번호 | 1 | |
| 번호 | 구분 | 내 용 | | | | |
| 1 | 제품명 | 슈퍼콜리 | | | | |
| 2 | 식품의 유형 | 과·저가음료 | | | | |
| 3 | 등록시조(년월) 보고 연월일 | 2016년 6월 29일 | | | | |
| 4 | 작성자와 작성연월일 | 이지현 (2017년 1월 3일) | | | | |
| 5 | 성분배합비율(%) | 브로콜리 100% | | | | |
| 6 | 제조방법 | 별도 첨부 | | | | |
| 7 | 제조(포장)단위 | 1, 2, 5, 8, 10, 15, 18, 20, 100, 150, 180, 200 kg | | | | |
| 8 | 원재료의 규격 | 구분 | 항목 | 법적규격 | 사내규격 | |
| | | 생물학적 위해요소 | 대장균군 | 음성 | 음성 | |
| | | 화학적 위해요소 | 타르색소 | 불검출 | 불검출 | |
| | | 물리적 위해요소 | 이물 | Fe | φ2.0 mm 이상 불검출 | φ2.0 mm 이상 불검출 |
| | | | | Sus | - | φ2.5 mm 이상 불검출 |
| | | 품질규격 | 수분(%) | - | 80 이하 | |
| 9 | 보관·유통 상의 주의사항 | 직사광선을 피하고 실온보관 및 유통. 한번 개봉된 제품을 재동결하면 품질이 변질될 수 있음. | | | | |
| 10 | 제품종도 및 유통기한 | 제품종도 : 식용 제조가공 시 알코올 사용 유통기한 : 제조일로부터 24개월 (실온 1-35°C) | | | | |
| 11 | 포장방법 및 재질 | 포장방법: 케이를 타이틀 이용한 내포장 밀봉 후 용기 포장 포장재질: 내포장-비닐(폴리에틸렌) / 외포장-박스(종이) | | | | |
| 12 | 표시사항 | 제품명, 식품의 유형, 원재료명 및 함량, 제조원, 판매원, 반품 및 교환, 유통기한, 보관방법 및 주의사항, 포장재질 | | | | |
| 13 | 유의사항 | | | | | |
| 14 | 선택방법 | | | | | |
| 15 | 비 고 | 식품위생법 시행 규정 제 31조 1항 자가품질검사에 의거하여 타르색소, 합성조료료 및 신희방지제를 사용하지 않아 검사를 생략함. | | | | |

Fig 86. 슈퍼콜리 제조를 위한 제품 규격 설정

○ PEF 처리된 브로콜리의 제품 규격을 설정하기 위하여 식품위생법 식품공전에 준하였으며, 식품 안전관리를 위해 한국식품안전관리인증(HACCP)을 받고자함. 이에 따라 생물학적, 화학적, 물리적 위해요소를 설정하였음. 생물학적으로는 대장균군은 음성이며, 화학적 위해요소는 불검출 되어야 함. 또한 물리적 위해요소는 세척 및 미산성수 처리를 반복적으로 실시함으로써 불검출을 목표로 함.

8. 개발된 농산물 1종 및 소재 2종의 시제품 생산

가. PEF 처리된 브로콜리 생산을 위한 원물 입고 규격 설정

○ 제주도 제주시 한림읍에 위치한 어랑진 영농조합법인으로부터 받은 브로콜리의 식품섭취 안전성을 확보하고자 입고 기준을 설정하고자 함. 병원성 미생물을 확인하기 위하여 국가인증기관을 통

해 살모넬라, 황색포도상구균, 리스테리아모노사이토제네스 등을 검사하여 입고기준을 설정함. 입고되는 원물에 대해 모두 수행하여, 식품가공시 병원성미생물이 유입되는 것을 방지하고자 함.

검 사 성 적 서

발급번호 : IB20160715-0018 접수번호 : 일반-16-0322-11

| 제품명 | 브로콜리작증액 | 제조일자나 유통기한 또는 제조번호 | - |
|---|------------------------------------|--------------------|---------------|
| 의뢰 업소명 | ㈜비케이바이오제주지점 | 의뢰 대표자 | 최혁준 |
| 의뢰 소재지 | 제주특별자치도 제주시 구좌읍 일주동로 2706-38 (한동리) | | |
| 접수년월일 | 2016. 7. 4 | 검사완료일 | 2016. 7. 15 |
| 식품유형 | - | 검사목적 | 기타 |
| 시험 항목 및 결과 | | | |
| 시험항목 | 기준 | 결과 | 시험방법 |
| 살모넬라 | - | 음성 | 시험방법 제 9.3.11 |
| 황색포도상구균 | - | 음성 | 시험방법 제 9.3.12 |
| 크로스트리디움퍼프란젠스 | - | 음성 | 시험방법 제 9.3.14 |
| 리스테리아모노사이토제네스 | - | 음성 | 시험방법 제 9.3.15 |
| 장출혈성대장균 | - | 음성 | 시험방법 제 9.3.16 |
| 바실러스세레우스(음성) | - | 음성 | 시험방법 제 9.3.18 |
| 판정 : - | 검사자 : 조화영 | | |
| 비고 : | 책임자 : 오현경 | | |
| *상기 판정은 의뢰된 시험항목에 한함 | | | |
| 위와 같이 검사성적서를 발급합니다. | | | |
| 2016 년 7 월 15 일 | | | |
| 제주대학교생명과학기술혁신센터장  | | | |
| 63243 제주 제주시 제주대학교 102 제주대학교 생명과학기술혁신센터 TEL : 064-754-2136 FAX : 064-726-3539 | | | |

Fig 87. 브로콜리 입고 규격 설정을 위한 병원성 미생물 평가

- 대부분의 브로콜리는 유기농을 이용하여 제품을 생산하고자 하지만, 농작물의 안전한 재배를 위해 농약을 사용하는 경우가 많음. 잔류농약이 식품상에 존재할시, 잔존 농약이 지속적으로 체내에 유입되고 축적될 경우, 만성장애를 일으킬 수 있는 위험성이 있음.
- 잔류농약은 간단하게 물로 세척하여도 씻겨갈 수 있으므로, 식품은 안전성을 증가시키기 위해 320종의 잔류농약을 초기에 검사하고자 함.

| DASAN | | 검정증명서 (Certificate of Analysis) | |
|--|---|------------------------------------|--------------|
| 신청인 (Applicant) | 성명: (주)비케이비이오 보핵존 주소(Address): 제주 제주시 구좌읍 일주동로 2706-3 전화번호: - | 생년월일: - | 잔류번호: - |
| 접수번호 | CP17-00691 | 접수일자 | 2017-04-26 |
| 검정 품목 (Name of Product) | 브로콜리 | | |
| 시료 횟수 및 중량 (Quantity of Samples) | 1회 | | |
| 검정 항목 (Analytical Items) | 잔류농약검사320항분 | | |
| 검정 목적 (Analytical Purpose) | 신고품 | | |
| 검정 결과 (Analytical Results) | 아래 허용량범위 내이지 성분은 발견됨 (검출 2항목) | | |
| 순번 | 물질명 | 단위 | 잔류허용기준 |
| 1 | Ethionex | mg/kg | 검출량범위 최대 0.2 |
| 2 | Metabixyl | mg/kg | CODEX 0.5 |
| <p>「농수산품 품질관리법」 제98조 및 같은 법 시행규칙 제126조에 따라 검정된 시료에 대한 검정성적명을 귀하 같이 증명합니다. (We hereby certify that the above mentioned samples have been analyzed in accordance with the provisions of Article 98 of the Agricultural and fishery Products Quality Management Act; and Article 126 of the Enforcement Rule of the Act.)</p> <p>다산생명과학원 (주) 2017년 5월 1일</p> <p>62371 제주광역시 남원구 사갈리109번길 119 (우산동) F.062) 942-6691</p> | | | |

| Oatc | | 시험성적서 | |
|---|---------------------|------------------------------------|-------------|
| (08595)서울특별시 금천구 영인로 1130, 806호 (가산동, 디지털라이더빌딩) TEL : 070-4644-8831 FAX: 070-4632-1902 www.oatc.co.kr | | | |
| * 발급번호: 잔류농약17-02-0684호 | | | |
| 신청인 | 성명(가명명) | (주)비케이비이오 | 생년월일 |
| | 주소 | 제주특별자치도 제주시 구좌읍 일주동로 2706-24 (한동리) | 전화번호 |
| | | 064-763-8600 | |
| 생산자 | 성명 | - | |
| | 생산지(재배단지) | - | |
| 접수번호 | ORBT(PE)-17-02-0684 | | |
| 접수일자 | 2017년 07월 11일 | | |
| 검사품목 | 브로콜리(입찰수) | | |
| 검사목적 | 참고용 | | |
| 검사항목 | 잔류농약-320종 | | |
| 검사결과 | 검출성분 | 검출지(mg/kg) | 허용기준(mg/kg) |
| | - | - | - |
| 담당원사명 | 성명 | 박경진 | |
| <p>검사결과와 검출성분 외 모든 성분 발견을 알립니다. 위와 같이 시험성적서를 교부합니다.</p> <p>Oatc</p> <p>* 본 시험성적서는 제품명 시료에 한하며, 광고, 판단, 홍보 및 소송 등의 법적 효력으로 사용될 수 없습니다.</p> <p>2017년 07월 17일</p> <p>주식회사 오메이타서 (OATC Inc.)</p> | | | |

Fig 88. 브로콜리 입고를 위한 잔류농약 검사(320종)

- 식품위생법 식품공전에 표시되어 있는 브로콜리 잔류농약 허용기준에 따르면 비펜트린 1.0 ppm, 이미다클로프리드 5.0 ppm, 테플루벤주론 1.0 ppm, 아세타미프리드 1.0 ppm, 아족시스트로빈 0.1 ppm, 피메트로진 1.0 ppm, 에마벡틴벤조에이트 0.1 ppm, 인독사카브 1.0 ppm., 디노테푸란 2.0 ppm, 티아메톡삼 1.0 ppm, 피리달릴 3.0 ppm, 메타플루미존 0.3 ppm, 아이소티아닐 0.5 ppm, 아미 설브롬 2.0 ppm, 플루벤디아마이드 3.0 ppm, 그리고 설포사플로르 2.0 ppm이 넘지 않는 잔류농약 기준으로 입고기준을 설정하였음.

나. PEF 처리된 브로콜리 식품유형별 제품 기준 확증

(1) PEF 처리된 브로콜리 분말의 제품 확증

- 입고된 브로콜리의 이물을 제거하기 위하여 세척한 후 초기미생물 제어를 위해 미산성수를 이용해 살균함. 30 kW PEF 기기를 사용하며, 전기장 처리를 위해 PEF 기기 설정은 specific energy 7 kJ, frequency 90~100 Hz, 그리고 belt speed 1.0으로 맞추어 진행함. Belt chamber를 통해 PEF 처리된 브로콜리는 2 h 동안 상온에서 효소반응을 유도함. 이후 75°C에서 열풍건조기를 사용하여 건조함.
- 또한 건조후 sulforaphane 함량이 유사한 동결건조된 브로콜리를 분말화한 후 빛이 투과되지 않는 포장용기를 사용하여 유통함.

- 건조된 PEF 처리된 브로콜리는 미분쇄기를 이용하여 분말화한 후 진공포장지를 이용하여 진공 상태로 냉동보관 실시함.

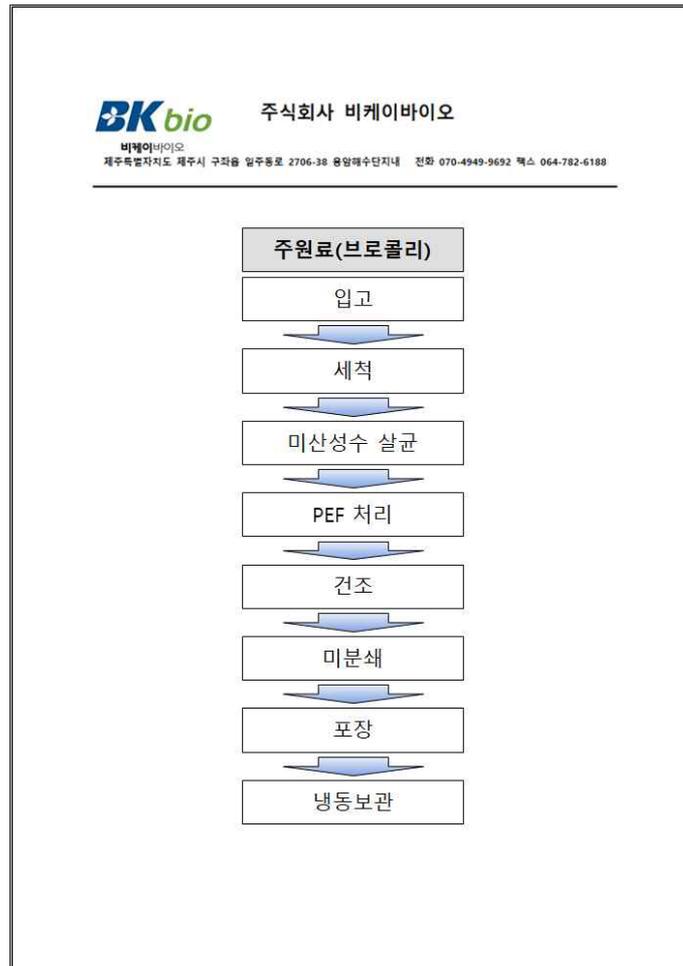


Fig 89. PEF 처리된 브로콜리 분말의 제조공정도

112-03BY-26HK-7735-QFS

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

| | | | | |
|------|---------------------------------|---|--------|-------------|
| 보고인 | 영명(법인명) 최혁준 | 생년월일(법인번호) 1963년 09월 27일 | | |
| | 주소 제주특별자치도 제주시 일주동로 2706-38 | 전화번호 휴대전화 01068593095 | | |
| 영업소 | 영칭(상호) (주)비케이바이오 | | | |
| | 소재지 제주특별자치도 제주시 일주동로 2706-38 | | | |
| 제품정보 | 식품의 유형 | 과, 채, 가공식품류 | 명업등록번호 | 20140627715 |
| | 제품명 | 슈퍼콜리 | | |
| | 유통기한 | 제조일로부터 24개월 | | |
| | 품질유지기한 | 해당없음 | | |
| | 원재료 또는 성분명 및 해당 비율 | 햇감에 기재 | | |
| | 용도 용법 | 햇감에 기재 | | |
| | 포장방법 및 포장재질 | 실온보관 PE | | |
| | 포장량별 및 포장단위 | 100g, 200g, 500g, 1kg, 1.5kg, 2kg, 5kg, 10kg, 20kg, 50kg, 100kg | | |
| | 성상 | 고유의 색택과 향미를 가지며 이미 ?이취가 없어야 한다. | | |
| | 고열화·저열화 식품 예 외 여부 | <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니요 <input checked="" type="checkbox"/> 해당 없음 | | |
| 기타 | | | | |

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사장을 보고합니다.

2016년 08월 18일
보고인 최혁준

제주특별자치도 제주시장 귀하

| | |
|--------|----------------|
| 등록보고번호 | 20140627715-45 |
| 처리부서 | 사회복지위생국 위생관리과 |
| 처리과성명 | 김창아 |
| 처리일자 | 2016년 08월 19일 |

본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

Fig 90. 슈퍼콜리 분말의 식품 품목제조보고서

(2) PEF 처리된 브로콜리 액기스의 제품 확증

- 입고된 브로콜리의 이물을 제거하기 위하여 세척한 후 초기미생물 제어를 위해 미산성수를 이용해 살균함. 30 kW PEF 기기를 사용하며, 전기장 처리를 위해 PEF 기기 설정은 specific energy 7 kJ, frequency 90~100 Hz, 그리고 belt speed 1.0으로 맞추어 진행함. Belt chamber를 통해 PEF 처리된 브로콜리는 2 h 동안 상온에서 효소반응을 유도함. 이후 착즙기(성창기계)를 이용하여 착즙한 후 사용전까지 냉동 또는 냉장보관함.

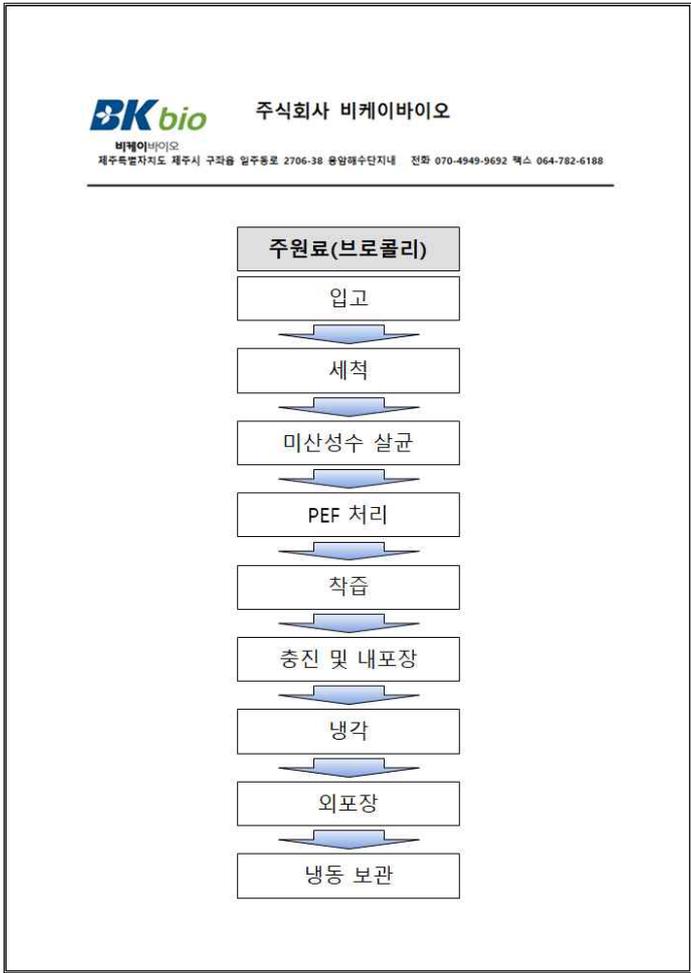


Fig 91. PEF 처리된 브로콜리 액기스의 제조공정도

(3) PEF 처리된 브로콜리 퓨레의 제품 확증

- 입고된 브로콜리의 이물을 제거하기 위하여 세척한 후 초기미생물 제어를 위해 미산성수를 이용해 살균함. 30 kW PEF 기기를 사용하며, 전기장 처리를 위해 PEF 기기 설정은 specific energy 7 kJ, frequency 90~100 Hz, 그리고 belt speed 1.0으로 맞추어 진행함. Belt chamber를 통해 PEF 처리된 브로콜리는 2 h 동안 상온에서 효소반응을 유도함. 이후 파쇄기를 이용하여 착즙한 후 사용전까지 냉동보관함.

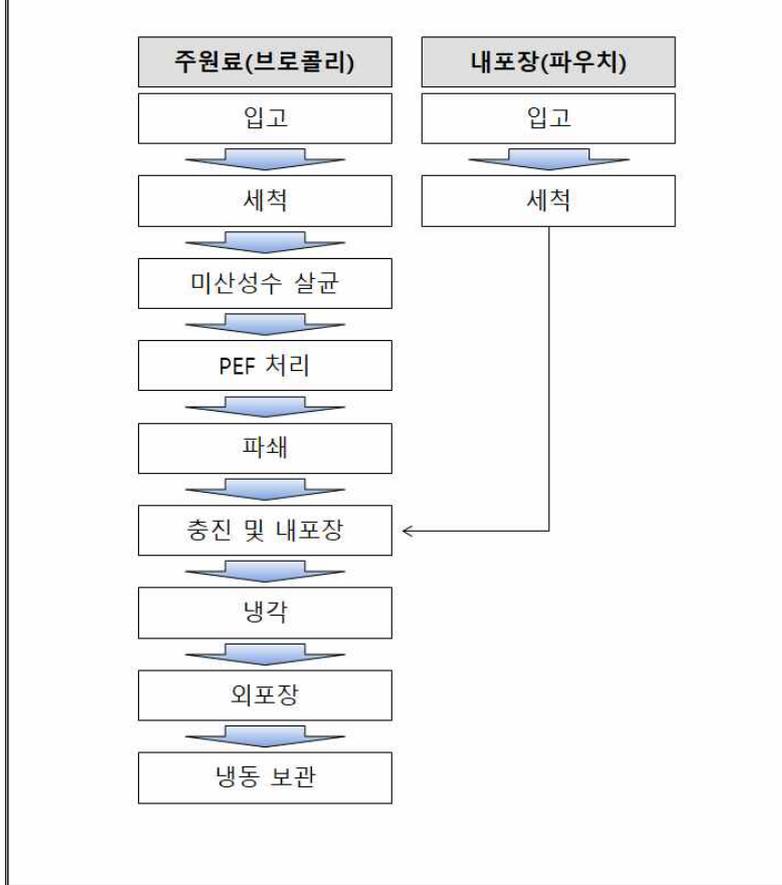


Fig 92. PEF 처리된 브로콜리 퓨레의 제조공정도

(4) PEF 처리된 원물 및 간편 브로콜리의 제품 확증

- 입고된 브로콜리의 이물을 제거하기 위하여 세척한 후 초기미생물 제어를 위해 미산성수를 이용해 살균함. 30 kW PEF 기기를 사용하며, 전기장 처리를 위해 PEF 기기 설정은 specific energy 7 kJ, frequency 90~100 Hz, 그리고 belt speed 1.0으로 맞추어 진행함. Belt chamber를 통해 PEF 처리된 브로콜리는 2 h 동안 상온에서 효소반응을 유도함. 이후 각 브로콜리에 대해 탁구공 크기로 절단함. 또한 장기보관을 위해 진공상태에서 냉장보관하며, 즉시 출고시 플라스틱 트레이 보관하여 냉동상태로 유통함.
- 또한 원물 그자체로 유통 및 납품하기 위하여 PEF 처리된 브로콜리는 플라스틱 트레이에 보관하여 냉장상태(0~4℃)로 유통함.



주식회사 비케이바이오

비케이바이오
제주특별자치도 제주시 구좌읍 일주동로 2706-38 용암해수단지내 전화 070-4949-9692 팩스 064-782-6188



Fig 93. PEF 처리된 간편 브로콜리의 제조공정도

다. PEF 처리된 브로콜리 제품별 원가 분석

○ 개발된 원물 및 소재의 원가 계산은 아래의 표를 통해 나타내었음.

Table 48. 브로콜리 원물 및 소재의 가공공정에 따른 원가표

| kg당 원가 | 슈퍼콜리 (원물) | 슈퍼콜리 (간편) | 퓨레 | 액기스 | 분말 (55℃) | 분말 (동결건조) |
|--------|--------------|--------------|-------|-------|-------------|--------------|
| 원재료 | 2,000 | 2,000 | 2,000 | 2,000 | 2,000 | 2,000 |
| 인건비 | 1,000 | 1,000 | 500 | 500 | 500 | 500 |
| 가공비 | 400 | 450 | 2400 | 3400 | 4400 | 20400 |
| 포장료 | 70 | 70 | 400 | 400 | 100 | 100 |
| 단가(Kg) | 3,470 | 3,520 | 5,300 | 6,300 | 7,000 | 23,000 |

라. PEF 처리된 브로콜리 푸레의 제품 디자인 확증



Fig 94. PEF 처리된 브로콜리의 포장 디자인

- PEF 처리에 의해 sulforaphane 기능성이 향상된 브로콜리의 포장 디자인은 위의 Fig 94와 같음. 자사 BtoC 브랜드인 Honestin와 함께 브로콜리 꽃(화퇴)색을 유사하게 나타내어 상단에 표시하고, 다소 소비자에게 어렵게 다가갈 수 있는 PEF는 쉽게 '손질'로 나타내어 브로콜리 가지 색상과 유사한 배경 위 제주 손질 브로콜리로 표시하였음.

제 2 절 <제4세부기관(위탁) : 어랑진영농조합법인> 십자화과 식물들의 성체 및 싹의 종류별 품종 연구와 원료 수급 체계 확립

1. 선정된 품종의 효율적이고 경제적인 수급 체계를 제시

가. 선정된 품종의 재배, 수급, 공급의 제공법 확립

(1) 십자화과 식물 중 브로콜리의 재배환경

- 브로콜리 2011년 재배면적은 전국 1,737 ha이며 그중 제주도 재배면적은 1,373 ha로서 79%를 점유하고 있고 생산량은 14,818톤으로 73%를 차지하고 있음.

Table 49. 브로콜리 재배면적 및 생산량

| 구분 | | 2000 | 2002 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 |
|------------------|---------|------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 재배 면적 (ha) | 전국 | 28 | 150 | 1,762 | 1,771 | 1,668 | 1,717 | 1,639 | 1,737 |
| | 제주 | 13 | 94 | 1,285 | 1,355 | 1,190 | 1,255 | 1,306 | 1,373 |
| | 전국대비(%) | 46 | 63 | 73 | 77 | 71 | 73 | 80 | 79 |
| 생산량 (M/T) | 전국 | 778 | 3,075 | 40,065 | 38,852 | 35,562 | 25,647 | 27,231 | 20,706 |
| | 제주 | 409 | 1,770 | 25,682 | 28,301 | 23,800 | 17,002 | 22,514 | 14,829 |
| | 전국대비(%) | 51 | 58 | 64 | 73 | 67 | 66 | 83 | 72 |

*자료 : 2011 채소류생산실적, 농림부

- 브로콜리의 재배면적은 2000년도부터 2007년도까지 증세의 추세를 보였으나 이후 2011년도까지는 증감을 하는 추세임.
- 브로콜리의 전국 생산량은 2000년도부터 2006년도까지 증세 추세를 보였으나 이후 2011년까지 생산량이 감소하였음.

Table 50. 브로콜리 재배작형 별 파종시기 및 수확시기

| 작형 | 파종기 | 수확기 | 비고 |
|------|---------|----------|-----------------|
| 봄재배 | 1~3월 | 4~6월 | 난지, 가온육묘, 터널재배 |
| | 3~4월 | 6~7월 | 고랭지, 가온육묘, 터널재배 |
| 여름재배 | 4~5월 | 7~8월 | 터널재배 |
| 가을재배 | 6~7월 상순 | 9월 | 고랭지, 극조생종 |
| | 7월 중·하순 | 10월 상순 | 고랭지, 극조생, 조생 |
| | 7월 하순 | 11월 상순 | 정화퇴, 정화퇴 및 측지수확 |
| 겨울재배 | 9~12월 | 이듬해 2~4월 | 난지, 정화퇴 및 측화퇴수확 |

- 브로콜리의 재배작형은 크게 봄 재배, 여름 재배, 가을 재배, 겨울 재배로 확인 할 수 있으며, 봄 재배의 경우 1~3월에 파종하여 4~6월에 수확하는 난지에서 재배하는 방법이 있고, 3~4월에 파종하여 6~7월에 수확하는 고랭지에서 재배하는 방법이 있음.
- 여름 재배의 경우 4~5월에 파종하여 7~8월에 수확을 하기 때문에 터널재배를 실시하고, 가을 재배의 경우 6~7월에 파종하여 9~11월에 수확을 하기 때문에 고랭지에서 재배하며, 극조생이나 조생종을 재배함.
- 겨울 재배는 9~12월에 파종하여 다음해 2~4월에 수확을 하기 때문에 난지에서 재배를 함.
- 브로콜리의 생육온도는 25℃에서 발아를 시작하고 잎, 줄기 성장 시에는 15~25℃조건(주야간 온

도차 : 3~5℃), 꽃 봉오리 발육 시에는 15~18℃조건에서 재배를 실시함.

Table 51. 브로콜리 꽃눈분화 온도

| 구분 | 조생종 | 중생종 | 만생종 |
|-----------------|----------------------|-----------|---------|
| 생육일수 (파종-수확) | 120일 이하 | 120~145일 | 145일 이상 |
| 화아분화 감응조건 | 15℃ 3~4주 (20℃ 6주) | 15℃, 6주 | 15℃, 6주 |
| 감응시기 | 본엽 5~6매 | 본엽 10~12매 | 본엽 15매 |

- 화아분화를 유기하는데 필요한 온도는 극조생종 및 조생종은 22℃이하, 중생종은 17℃이하, 만생종은 2~3℃가 적당함.
- 출퇴 후 꽃봉오리 발육적온은 15~18℃이며, 저온에 감응하는 모종의 시기는 극조생종이 파종 후 3~5주, 조생종은 4~6주, 중생종은 5~6주에서 10℃ 정도의 저온처리로 출퇴가 가능함.
- 브로콜리의 육모온도는 겨울파종의 경우 파종 후 25~28℃로 재배하고 싹튼 후 20~25℃에서 생육시키며, 본엽이 3~4매 자란 후에 온도조건 13~15℃에서 50일간 생육시킴.
- 여름파종의 경우에는 차광망 등을 설치하여 온도를 최대한 낮추어 생육시키며, 본엽이 3~4매 자란 후에 30~35일간 생육시킴.
- 브로콜리의 수확은 극조생종이 약 250~300g, 중만생종은 300~400g 정도의 크기에 도달하고, 화뢰의 작은 꽃들이 싹알정도 크기가 되면 즉시 수확을 함.
- 수확시 이슬 또는 물방울이 화뢰에 묻어 있을 경우 저장 중 곰팡이나 세균에 의한 부패를 가속화 시키므로 보관을 위해서는 제거해 주어야 함.

(2) 십자화과 식물 중 양배추, 적양배추의 재배환경

- 양배추 2011년 재배면적은 전국 6,767 ha이며 그중 제주도는 1,699 ha로써 25%를 점유하고 있고 생산량은 112,087톤으로 30%를 차지하고 있음.

Table 52. 양배추 재배면적 및 생산량

| 구분 | | 1985 | 1990 | 2000 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 |
|------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 재배 면적 (ha) | 전국 | 3,713 | 3,933 | 6,077 | 6,089 | 5,993 | 4,524 | 6,767 |
| | 제주 | 1,181 | 1,519 | 2,255 | 2,178 | 2,239 | 1,673 | 1,699 |
| | 전국대비(%) | 32 | 39 | 37 | 36 | 37 | 37 | 25 |
| 생산량 (M/T) | 전국 | 130,615 | 144,334 | 274,125 | 328,148 | 331,429 | 252,685 | 368,486 |
| | 제주 | 48,693 | 84,208 | 114,577 | 130,636 | 134,228 | 99,246 | 112,087 |
| | 전국대비(%) | 37 | 58 | 42 | 40 | 41 | 39 | 30 |

*자료 : 2012 농림수산물부

- 양배추의 재배면적은 2000년도 까지 증세추세를 보이거나, 2000년도 후부터는 증감을 하는 추세임.
- 양배추의 생산량은 2009년도 까지 증세추세를 보여주고 있으며, 2010년도에 감소하였으나 2011년도에 다시 증세되는 추세임.

Table 53. 양배추, 적양배추의 재배작형 별 파종시기 및 수확시기

| 종류 | 작형 | 파종기 | 수확기 |
|------|--------|---------------|-----------|
| 양배추 | 춘파재배 | 2월 하순 ~ 3월 중순 | 5월 ~ 7월 |
| | 준고냉지재배 | 4월 중순 ~ 4월 하순 | 7월 ~ 8월 |
| | 고랭지재배 | 4월 하순 ~ 5월 중순 | 8월 ~ 9월 |
| | 하파재배 | 6월 ~ 7월 | 10월 ~ 11월 |
| | 하파재배 | 7월 하순 ~ 8월 상순 | 12월 ~ 3월 |
| | 추파재배 | 9월 ~ 10월 | 4월 ~ 5월 |
| 적양배추 | 냉량지 | 3월 하순 | 7월 하순 |
| | | 7월 | 10월 |
| | 중간지 | 3월 | 6월 하순 |
| | | 7월 중순 | 11월 ~ 1월 |
| | 난지 | 2월 상순 | 6월 중순 |
| | | 7월 하순 | 11월 ~ 1월 |

- 양배추와 적양배추의 생육특성중 발아 휴면기간은 보통 30~50일이며, 70일인 것도 있음.
- 발아의 최적온도는 15~30℃이며, 최저 4~8℃, 최고 35℃에서 발아를 시작하고, 40℃이상에서는 발아가 되지 않음.

Table 54. 양배추, 적양배추의 생육온도

| 최적온도 | 최고온도 | 최저온도 | 동해온도 | 생육장해온도 |
|--------|------|------|------|--------|
| 15~20℃ | 25℃ | 5℃ | -12℃ | 30℃ |

- 양배추와 적양배추의 생육온도는 최저 5℃ ~ 최고 25℃에서 생육하며, 최적온도는 15~20℃이다. -12℃에서는 동해를 입고, 30℃에서는 생육의 장해를 받음.
- 양배추와 적양배추는 모가 어릴 때 성장이 느리고 집약적 관리를 위해 육모재배를 한다. 파종 후 발아하면 쉬음을 하고, 본엽이 2~3매 되었을 때 가식을 함.
- 여름재배는 파종 후 35~35일된 본잎 5~6장인 모종을 정식함.
- 봄 또는 겨울재배는 파종 후 40~45일된 본잎 4~5장인 모종을 정식함.
- 조생종의 수확은 12월 이전에 수확하는 것이 유리하고, 만생종은 월동 재배작형으로 겨울부터 이른 봄까지 수확하는 것이 유리함.

(3) 십자화과 식물 중 콜리플라워의 재배환경

- 콜리플라워는 아직 양채류 품목 중 생산비중이 적은 품목으로 2000년도까지는 재배면적의 소규모 등락이 반복되어 왔으나, 이후부터는 점차로 생산량과 소비가 늘고 있다. 주생산지역은 평창, 남제주, 용인, 대전, 김해임.

Table 55. 콜리플라워 재배면적 및 생산량

| 구분 | 1990 | 1995 | 2000 | 2005 | 2010 | 2011 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 재배면적 (ha) | 24 | 14 | 15 | 38 | 52 | 57 |
| 수량 (kg/10ha) | 2,004 | 2,282 | 2,100 | 2,294 | 2,953 | 2,130 |
| 생산량 (M/T) | 479 | 324 | 315 | 867 | 1,533 | 1,214 |

*자료 : 2012 농림부 채소생산실적

- 콜리플라워의 재배면적의 경우 1990년도에서 1995년까지 감소하는 추세를 보였으나 이후 2011년도까지 증세하는 추세임.
- 콜리플라워의 생산량은 1990년도 ~ 2000년도까지 증감하는 추세를 보였으나, 이후 2010년까지 증가하였으며, 2011년도에는 생산량이 감소되었음.

Table 56. 콜리플라워의 파종시기 및 수확시기

| 작형 | 파종기 | 수확기 |
|------|---------|-------------|
| 봄재배 | 2월 ~ 3월 | 7월 상순 |
| 여름재배 | 7월 | 이듬해 2월 ~ 3월 |
| 가을재배 | 9월 중순 | 5월 ~ 6월 |

*자료 : 2012. 농림부 채소생산실적

- 봄재배의 경우 2~3월에 파종을 하여 7월 상순까지 재배를 끝냄. 보통 극조생종과 조생종을 봄재배를 실시함.
- 여름재배의 경우 고온에서 꽃눈분화를 하는 조생종보다 기온이 내려가야 꽃눈분화를 하는 만생종을 재배하여, 여름에 파종한 후 다음해 2~3월에 수확을 함.
- 가을재배의 경우 9월 중순에 파종하여 본잎이 4~5장의 유표를 정식해서 월동을 하고 다음해 5~6월에 수확을 한다. 9월 중하순에는 기후가 서늘하여 육묘하기 좋아서 9월 중순이전에 파종을 실시함.

Table 57. 콜리플라워의 화아분화 감응온도 및 잎수

| 조만성 | 화아분화 감응온도 | 화아분화 감응분화잎수 | 화아분화 감응전개잎수 | 화뢰의 발육적온 |
|------|-----------|-------------|-------------|----------|
| 극조생종 | 23℃ 이하 | 12~15장 | 5장 이상 | 18~20℃ |
| 조생종 | 20℃ 이하 | 22장 | 7~8장 | 17~18℃ |
| 중생종 | 17℃ 이하 | 27장 | 11~12장 | 15~18℃ |
| 만생종 | 15℃ 이하 | 42장 | 15장 | 15~18℃ |

- 콜리플라워의 화아분화 감응온도는 극조생종이 가장 높은 23℃에서 감응하며 기온이 낮아짐에 따라 만생종이 가장 낮은 15℃에서 감응함.
- 화뢰의 발육적온 또한 극조생종이 가장 높은 18~20℃이며, 중생종과 만생종이 가장 낮은 15~18℃임.
- 감응분화잎수와 감응전개잎수는 극조생종이 가장 적으며, 차례로 만생종이 가장 많음.
- 가을재배 콜리플라워의 수확은 기온이 급격하게 영하로 떨어지면 얼어버리므로 영하로 떨어지기 전에 수확함. 기온이 급격하게 떨어지는 시점이 되면 작은 꽃봉오리 상태에서 수확해야함.

(4) 십자화과 식물 중 무의 재배환경

- 시도별 무 재배면적은 전북(1,231 ha), 경기(1,013 ha), 충남(985 ha), 전남(815 ha) 순으로 나왔으며, 이들 4개 시도의 면적이 전국의 73.6%를 차지함. 제주지역의 무 재배면적은 8.4 ha로 제일 적은 재배면적을 차지하였음.

Table 58. 무 재배면적 및 생산량

| 구분 | 2000 | 2001 | 2005 | 2008 | 2010 | 2011 |
|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 재배면적(ha) | 14,627 | 13,689 | 8,854 | 8,948 | 7,473 | 9,748 |
| 수량(kg/10ha) | 6,033 | 6,440 | 6,542 | 7,544 | 6,333 | 7,354 |
| 생산량(M/T) | 882,404 | 881,526 | 579,212 | 675,013 | 473,230 | 716,854 |

자료 : 2014. 사회통계국 무 재배면적 조사

- 무의 재배면적과 생산량의 경우 2000년도부터 2010년까지 감소하는 추세를 보였으나, 2011년도에 다시 증가하는 추세임.

Table 59. 무의 파종시기 및 수확시기

| 작형 | 파종기 | 수확기 |
|----------|---------------|-----------------|
| 봄재배 | 3월 중순 ~ 4월 하순 | 5월 하순 ~ 6월 하순 |
| 고랭지 여름재배 | 6월 ~ 7월 | 8월 ~ 9월 |
| 가을재배 | 8월 상순 ~ 9월 중순 | 10월 중순 ~ 12월 하순 |
| 월동재배 | 9월 하순 | 12월 하순 ~ 3월 |

- 무는 일반적으로 서늘한 기후를 좋아하나, 추위와 더위에는 약한 편임.
- 생육온도는 17~20℃ 정도이고, 비교적 낮은 온도에서 견디지만, 다 자란 무는 0℃ 정도에서 동해 피해를 입음.
- 발아단계는 15~35℃에서 진행되며 발아적온은 24~28℃이고, 최저 15℃이상 이어야함.
- 재배단계의 생육적온은 낮(17~23℃), 밤(15~20℃), 지온(21~23℃)임.
- 화아분화는 7~13℃ 이하에서 10~14일 경과 후 감응을 하며, 떡잎이 전개 될 때 5~7℃의 낮은 온도에서 가장 감응이 잘됨.
- 무는 일반적으로 낮은 온도에서 견디지만 겨울에 수확을 하는 가을무와 월동무의 경우 다 자란 무가 동해 피해를 입을 수 있기 때문에 기온에 유의 하여야함.

(5) 십자화과 식물 중 순무의 재배환경

- 순무는 강화도에서 자라는 특산물로써 아직 생산비중이 적은 품목이지만 2005년도까지는 재배면적과 생산량이 늘어나고 있음.

Table 60. 순무의 재배면적 및 생산량

| 구분 | 1994 | 1995 | 1996 | 2002 | 2004 | 2005 |
|----------|------|------|------|------|------|------|
| 재배면적(ha) | 26 | 56 | 77 | 85 | 112 | 120 |
| 생산량(M/T) | 6 | 13 | 18 | 20 | 26 | 28 |

*자료 : 2005. 강화군농업기술센터 순무 재배실태

- 순무의 총 재배면적은 120 ha로써 재배면적이 증가하는 추세이며, 순무의 10 ha당 생산량은 2,300 kg이고, 주 재배지역은 강화읍 지역 (옥림리, 월곶리, 용정리, 대산리)임.

Table 61. 순무의 파종시기 및 수확시기

| 작형 | 파종기 | 수확기 |
|------|---------------|-----------------|
| 봄재배 | 3월 중순 ~ 4월 상순 | 5월 중순 ~ 6월 중순 |
| 여름재배 | 6월 중순 | 7월 ~ 8월 |
| 가을재배 | 8월 중순 | 10월 하순 ~ 11월 상순 |

- 봄재배는 3월 중순 ~ 4월 상순에 파종하여 5월 중순 ~ 6월 중순에 수확을 하며, 하우스나 2중 텐넬 재배 시 파종기, 수확기를 앞당길 수 있음.
- 여름재배는 6월 중순에 파종하여 7~8월에 수확을 하며, 병해충이 심한 시기이기 때문에 경제적인 재배가 어려움.
- 가을재배는 8월 중순에 파종하여 10월 하순 ~ 11월 상순에 수확하기 때문에 가장 상품성이 좋은 재배방법임.
- 발아와 생육적온은 15~20℃이며, 최저 4~8℃온도에서 생육이 가능함. 서늘한 기후를 좋아하고 내한성이 강하여 -2℃에서도 동해를 받지 않는다.
- 화아분화는 유모기에 4℃에서 15일간 처리 시 개화를 촉진하게 됨.
- 순무의 수확은 파종 후 60~70일이면 수확이 가능하며, 저장은 0℃에서 30일정도 보관이 가능함.

(6) 선정된 품종(브로콜리, 적양배추)의 수급, 제공방법

- 십자화과 식물의 선정은 Sulforaphane (SF) 함량이 가장 높은 브로콜리(SF 함량 - 80 mg/100g D.W),와 적양배추(SF 함량 - 30 mg/100g D.W)를 선정하였음.
- 브로콜리와 적양배추의 수급을 하기 위해 어랑진 영농조합법인에서 재배를 실시하였음.

Table 62. 선정된 품종(브로콜리, 적양배추)의 재배시기

| 품종 | 파종시기 | 수확시기 | 재배면적(평) | 수확량(kg) |
|------|-----------|----------|---------|---------|
| 브로콜리 | 7월 ~ 8월 | 11월 ~ 3월 | 15,000 | 75,000 |
| | 11월 ~ 12월 | 5월 ~ 6월 | | |
| 적양배추 | 7월 ~ 8월 | 12월 ~ 3월 | 2,000 | 38,400 |

*어랑진 영농조합법인의 브로콜리, 적양배추 재배시기

- 브로콜리의 재배면적은 총 15,000평으로 Table 62과 같이 7월 ~ 8월에 파종하여 11월 ~ 3월에 수확하는 재배방법과 11월 ~ 12월에 파종하여 5월 ~ 6월에 수확하는 재배방법을 사용하고 있으며, 총 재배량은 75,000 kg(5 kg/평)임.
- 브로콜리의 수확 후 보관은 이슬이 화퇴에 묻어있지 않도록 제거한 후 0℃에서 비닐포장으로 보관함.
- 브로콜리의 출하 및 유통 시 보관은 8 kg 종이박스로 포장하여 출하하고, 출하 후 보관은 0℃에서 보관함.
- 적양배추의 재배면적은 총 2,000평으로 Table 62과 같이 7월 ~ 8월에 파종하여 12월 ~ 3월에 수확하는 재배방법을 사용하고 있으며, 총 재배량은 38,400 kg(19.2 kg/평)임.
- 적양배추의 수확 후 보관은 장기저장을 할 경우 1~5℃에서 저온저장을 실시하며, 단기저장을 할 경우에는 상온에서 보관을 실시함.
- 적양배추의 출하 및 유통 시 보관은 20kg 종이박스로 포장하여 출하하고, 유통시일에 따라 상온에서 저온(1~5℃)보관을 실시함.

2. 선정된 품종의 재배, 수급, 공급의 제공법 확립

가. 어랑진 영농조합법인의 재배환경

- 제주도 서쪽 지역에 위치하고 있으며, 자갈이 많은 화산회토 지반으로 강우량이 적고, 보수력이 좋으며 유기질이 풍부한 pH 6.0 정도인 토양과 서늘한 기후로써 브로콜리 재배에 최적지임.



Fig 95. 어랑진 영농조합법인의 위치

나. 브로콜리의 재배방법

- 브로콜리의 재배방법으로는 직파재배와 육묘이식재배가 있으며, 직파의 경우 잡초방제나 관리가 불편하여 현재 재배기술로는 트레이를 이용한 육묘이식 재배를 실시함.
- 육묘이식재배는 시판상토를 이용하여 128공 플러그트레이에 종자를 한 개씩 파종하여 10 ha당 35 ~ 40 상자 정도를 파종하며, 파종 후 종자가 보이지 않을 정도로 흙을 덮어주고 건조방지를 위해 신문지 등으로 덮어주며, 트레이는 지면에 직접 놓지 않도록 함.
- 어랑진 영농조합법인에서는 육묘이식재배 방식으로 7월 20일경부터 조생종 브로콜리를 파종하며, 10일 간격으로 중생종 만생종을 파종하고 30일정도 육묘를 실시하였음.



Fig 96. 육묘이식재배 방법을 위한 브로콜리 종자의 파종 (7월 파종 실시)



Fig 97. 브로콜리 종자 파종 후 30일간 육묘실시

- 30일간 브로콜리 종자의 육묘를 실시 한 후 본 밭 수가 5~6매의 모종은 정식을 실시함.
- 정식작업은 한낮은 피하고 흐린 날이나 오후에 정식을 실시하며, 정식 후에는 관수를 실시하였음.
- 정식 전 브로콜리 밭은 토양개량을 위해 10a 당 퇴비 약 2,000 kg과 토양검정결과에 따라 알맞은 양의 석회를 주고 고루 갈아주며, 비료를 주는 양은 10a 당 질소 12.3 kg, 인산 7.1 kg, 칼리 7.0 kg의 기준이고, 밑거름으로 인산비료 전체와 칼리비료 50%를 정식 10일 정도 전에 밭 전체에 고루 뿌리고 흙과 섞어줌.
- 본토에 유기질비료와 퇴비를 살포한 후 이랑폭 60 cm, 포기 사이는 30 cm 정도로 경운 후 채소 이식기 및 수작업을 통해 정식을 실시하였음.
- 웃거름은 첫 번째 정식 후 20~25일 경에 주고 두 번째 웃거름은 1차 웃거름 후 15~20일 경에 뿌려줌.
- 정식 후 30일 정도에는 진딧물, 배추나방, 파밤나방, 좀나방, 거세미나방 등 벌레에 대한 방제를 시작하여, 예찰을 통해 2~4회 정도 방제를 실시함.
- 노균병 방제를 위하여 11월 말, 12월 말 1월 중순 정도에 황수화제를 살포함.

다. 브로콜리의 수확방법

- 재배 후 수확 시기는 조생종일 경우 11월 말부터 수확이 가능하고, 중생종은 12월에서 1월 사이이며, 만생종은 1월에서 2월말까지 수확을 실시함.
- 브로콜리 수확은 꽃봉오리의 지름이 15cm 내외로 되었을 때 잎줄기를 2~3개 붙여서 줄기 길이

를 15~17 cm 길이로 수확을 실시함.

- 한 번에 수확하지 않고, 꽃봉오리 크기에 따라 잘 발달되고 단단한 것을 선별하여 수확하며, 수작업으로 수확을 실시함.
- 브로콜리는 수분함량이 90% 수준이기 때문에 수확과 동시에 수분흡수가 중단되어 2~3일 내에 시들기 때문에 상품성이 급격히 떨어지게 됨.
- 브로콜리의 상품성을 상승시키기 위해 수확 후 바로 5℃에서 예냉 시킨 후 운반하는 방법을 이용함.



Fig 98. 수확하기 전 브로콜리 밭

라. 브로콜리의 저장 및 출하 방법

- 브로콜리 보관 중 품질 저하의 주원인으로는 황화, 시들음, 색택 변화, 곰팡이병 및 무름병 감염, 이취 증가임.
- 브로콜리의 저장은 수확 후 5℃로 예냉된 브로콜리를 투기성 필름(유공 PE 0.03 mm)으로 포장하여 저온저장고(0℃)에 보관함.
- 저온저장고는 실제 온도 0℃를 확인해야 하며, 습도는 95% 이상을 유지하여야함.
- 습도가 낮을 시에는 가습기를 설치하고, 바닥에 지속적으로 물을 뿌려주는 방법으로 습도를 높여줌.

- 브로콜리의 보관 시 저장물은 벽에서 20 cm, 저장상자 1 m 마다 20 cm, 천정과 60 cm 이상 띄우며, 바닥에는 팔레트를 깔아주고 저장상자는 통기공이 많을 것으로 사용하여 보관을 실시함.
- 브로콜리의 보관은 보관시작 일로부터 1~2달 정도 보관이 가능하며, 1달 이후부터는 부패 물감이 나오기 시작하기 때문에 출하 전 선별작업을 실시함.



Fig 99. 저온저장고(0℃)와 보관중인 브로콜리

- 출하의 경우 선별된 브로콜리를 종이박스에 8~10 kg씩 포장하여 냉장탑차를 통해 운송을 하며, 여름철 이동시에는 철저한 온도관리를 실시한다.
- 냉장탑차의 운송이 불가 시에는 아이스박스(스티로폼 박스)를 이용하여 박스안에 얼음을 채워 넣어서 예냉 된 브로콜리를 운송함.
- 출하의 시기는 겨울철에는 11월 ~ 3월 말까지 저장 브로콜리가 나오며, 봄 재배의 경우 4월 ~ 5월까지 브로콜리가 출하되었음.



Fig 100. 브로콜리의 출하

3. 시제품 생산을 위한 원료 공급 및 산업화를 위한 재배 착수

가. 주관기관 브로콜리 공급을 위한 브로콜리 모종 구입 및 파종 실시

○ 2017년 12월에서 2018년 03월 브로콜리 재배를 위해 당사는 브로콜리 모종을 구매하였음.

Table 63. (주)비케이바이오 브로콜리 공급을 위한 모종 구매

| 연번 | 브로콜리 | 구매 일시 |
|----|--------|--------------|
| 1 | 슈퍼그레이스 | 2016. 11. 29 |
| 2 | 슈퍼그레이스 | 2017. 02. 02 |
| 3 | 슈퍼그레이스 | 2017. 02. 16 |
| 4 | 슈퍼그레이스 | 2017. 03. 22 |
| 5 | 슈퍼그레이스 | 2017. 06. 29 |
| 6 | 슈퍼그레이스 | 2017. 07. 06 |
| 7 | 슈퍼그레이스 | 2017. 07. 26 |
| 8 | 슈퍼그레이스 | 2017. 07. 31 |

○ 2017년 03월 이전에 구매한 브로콜리 모종은 브로콜리 재배 마지막 기간인 04~05월에 재배하기 위하여 구매하였음. 재배된 브로콜리는 주관기관인 (주)비케이바이오에 제공하거나 냉장창고에 보관하였음.



Fig 101. 브로콜리 재배를 위한 파종 실시

○ 이전 연도와 동일하게 육묘이식재배 방식으로 브로콜리를 파종하였음. 브로콜리 육묘이식재배를 이요할 경우 초기생육을 강하게 하면서 수확량을 높힐 수 있기 때문임. 밭에 직접 심어 지를 경우 초기 브로콜리 생육에 문제가 생길 수 있으며, 땅의 상태에 따라 상하거나, 벌레에 의한 새싹 손상으로 인해 브로콜리를 재배하지 못하는 경우가 발생함. 또한 넓지 않는 장소에서 키울 수 있기 때문에 편리함.

○ 파종 이후 30일동안의 육묘를 실시하여 일정한 크기까지 성장할 때 까지 관리하여 줌.

나. 주관기관 브로콜리 공급을 위한 브로콜리 재배



Fig 102. 브로콜리 재배를 위한 밭



Fig 103. 브로콜리 성장 4주



Fig 104. 재배된 브로콜리 보관을 하기 위한 저온저장고 및 보관방법

- 재배된 브로콜리를 저온에서 보관하기 위해서는 약 0~2℃의 온도 조건에서 습도 95% 이상을 유지해야함. 브로콜리 겉부분에 수분손실이 높아지게 되면 주변에 분포되어있는 수분의 최적조건에 의해 미생물생장이 높아지며, 곰팡이 발생확률이 높아지게 됨. 게다가 브로콜리의 황화현상과 함

깨 으깨지는 현상도 나타남.

- 이에 컨테이너에 비닐이 덮힌 상태로 브로콜리를 보관해야함.



Fig 105. 주관기관 브로콜리 공급을 위한 유통 과정

- 재배 또는 저온보관된 브로콜리를 유통하기 위해서는 외부 빛과 온도가 중요함. 물류 유통비를 절감하기 위하여 주관기관인 (주)비케이바이오와 협의를 통해 브로콜리를 이용한 제품을 생산할 경우 생산일자를 최소한으로 두어 물류 유통 횟수를 줄일 수 있도록 지속적으로 협의 중임.



Fig 106. 유기농 브로콜리 밭

- 일반 브로콜리의 경우 농약을 사용하여 잡초, 벌레 등을 제어할 수 있지만 유기농 밭의 경우, 잡초를 뽑지 않는 이상 성장이 완료될 때 까지 유지함. 최근 식품 트렌드에 따르면 농약을 사용하지

않는 유기농 과채류를 더욱 선호하고, 웰빙시대에 걸맞는 과채류 재배를 맞추어 가는 중임.

제 3 절 <제2세부기관(협동) : 중앙대학교 산학협력단> 설포라판(Sulforaphane) 증폭을 위한 펄스에너지(PEF) 처리 조건 확립, 품종 및 제품별 비교 평가

1. 펄스처리장치의 구조 및 작용기작

가. Batch 형 펄스처리 장치의 구조

(1) 펄스 전기장 장치 구조 및 처리 시스템의 개략적인 형태

- 펄스 전기장 처리 기술의 원리는 2개의 전극 사이에 대상물질을 위치시키고 Batch 형의 경우 전극 양단에 0.2 ~ 3 kV/cm 의 전압을 가하여 순간적으로 방전시켜 전기장을 형성시킴으로써 식품을 처리하는 기술임.
- PEF 장치 설비의 경우 전기 발생 장치 이외에 특별히 별도의 설비가 필요치 않아 간단하게 현장 적용이 가능하며, 기기장치의 도입 비용도 저렴하고 처리비용도 1-2 €/t 수준으로 저렴하여 열에너지에 대한 절약 효과가 뛰어나며, 연속적 공정으로 사용이 가능하여 식품 가공 기술로서 다양한 적용을 시도할 수 있음.
- 실험에 사용된 펄스 전기장 시스템의 외관은 Fig 107과 같다. 펄스 전기장 시스템을 구성하는 기본적인 요소는 직류 전원 장치(DC power supply), 에너지를 일시적으로 저장하기 위한 충전기(capacitor), 저장된 에너지를 순간적으로 방전시키기 위한 스위치(discharging switch), 대상물질을 처리하기 위한 처리 용기(treatment chamber with electrodes) 등이 있음.



Fig 107. 실험에 사용된 5 kW급 펄스전기장 발생장치 (HPV5, DIL, Germany)

- Batch 형의 경우 대상물을 처리하기 위한 처리 용기(treatment chamber with electrodes)의 형태는 Fig 108과 같음. Electrode에서 발생된 매우 짧은 고전압 전기장이 물을 매개로 하여 대상물에 처리가 됨.
- PEF 기술은 고체식품의 Batch 형 펄스 처리뿐만 아니라 액상제품의 경우 Continuous chamber를 통해 연속적 처리가 가능하며 미립자를 포함한 액상제품도 처리가 가능함 (Fig 109). 액상제품의 경우 펄스 전기장 처리를 통해 비가열 살균 효과를 얻을 수 있음.



Fig 108. Inside view of 5 kW pulse generator (사진 좌) and batch chamber module with commercial 250 mL scale batch chamber (사진 우)



Fig 109. PEF production line(사진 좌) ; continuous chamber(사진 우)

나. 처리 조건에 따른 처리조(Treatment chamber) 내부 전기장 형성 특성

(1) 펄스 전기장 처리 기술의 기본 원리

- 펄스 전기장 시스템을 구성하는 기본적인 요소는 직류 전원장치(DC power supply), 에너지를 저장하기 위한 축전기(capacitor) 등이 있음(Fig. 110). 고전압 펄스 전기장의 처리는 직류전원장치에서 발생된 고전압의 에너지를 축전기에 충전시킨 후 전기적 신호에 따라 스위치가 접촉되면 축전기에 축적된 에너지가 전극을 통해 처리 용기 내에 있는 대상물질에 방류됨으로써 이루어짐.
- 대부분의 식품은 많은 양의 수분을 함유하고 있기 때문에 식품에 고전압의 전기가 인가되면 짧은 시간 (수 μsec) 내에 고전압의 전류가 흐르게 됨. 고전압의 방전에 끝나면 스위치는 다시 떨어지고 고전압의 에너지는 다시 축전기에 충전되며 이와 같은 과정을 반복하게 됨.
- 충전과 방전 cycle은 매우 짧은 시간, 즉 ms에서 μs 사이에서 발생하게 되며, 충전의 시간보다는 방전의 시간이 매우 작음. 따라서 식품에 수 십번의 고전압이 방전되더라도 실제 방전되는 시간 1 s 이하로 매우 짧기 때문에 열의 발생이 거의 없음.

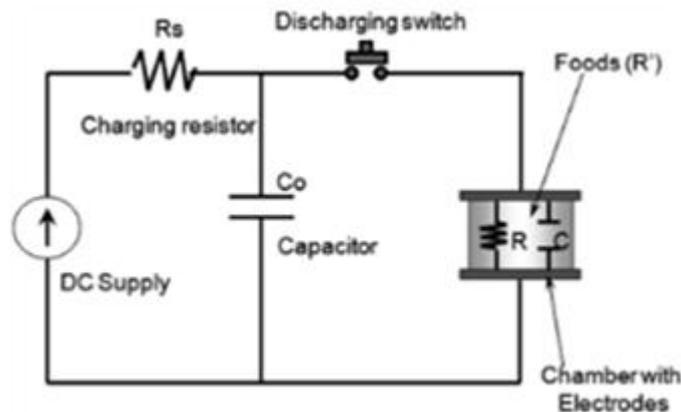


Fig 110. Schematic diagram of high voltage pulsed electric field system.

(2) 펄스 전기장을 통한 세포막 불활성화 기작

- 생물에 대한 고전압 펄스 전기장의 적용은 생물 세포막에 불안전성과 압력을 가져오게 되고 경우에 따라서는 세포막에 비가역적인 손상을 일으키고, 이온 수송의 변화, 효소의 구조 변화 등을 일으킴.

- 생물의 세포막은 펄스폭이 1 μs 정도의 매우 짧은 고전압 전기장에 놓이게 되면 세포막이 물리적으로 파괴가 됨. 펄스폭이 1 μs 정도로 짧으면 물 중에서 이온의 이동 속도는 전자에 비하여 느리므로 물 중의 각종 이온이 전극 사이를 이동할 수 없어 지금까지 알고 있던 전기분해나 전기영동과 같은 직류 전압 작용과 전혀 다른 현상이 생긴. 즉 액체 내 식품은 순간적으로 높은 전기장에 노출되어 세포막이 파괴가 됨.
- 고전압 펄스 전기장에 의한 생물의 세포막의 붕괴 메커니즘에 대해서는 여러 가지 이론이 제안되어 있으나 세포 내외의 전위차(transmembrane potential)와 세포막의 압축 이론으로 설명할 수 있음. 세포가 강력한 전기장에 놓이게 되면 인지질 이중층으로 구성된 세포막은 이온의 이동에 의하여 극성을 띠게 됨.
- 지방 이중층(lipid bilayer)은 불량 전기도체이므로 Fig 111에 나타낸 것과 같이 세포막 내외의 표면에는 이온이 축적되고 그 결과 transmembrane potential도 증가하며, 이 값이 임계값 1 V 이상이 되면 세포막 내외의 표면에 축적된 반대 전하의 인력에 의하여 세포막은 압축되며, 탄성한계 이상으로 압축되면 세포막은 파괴되거나 구멍이 생겨 파괴됨.

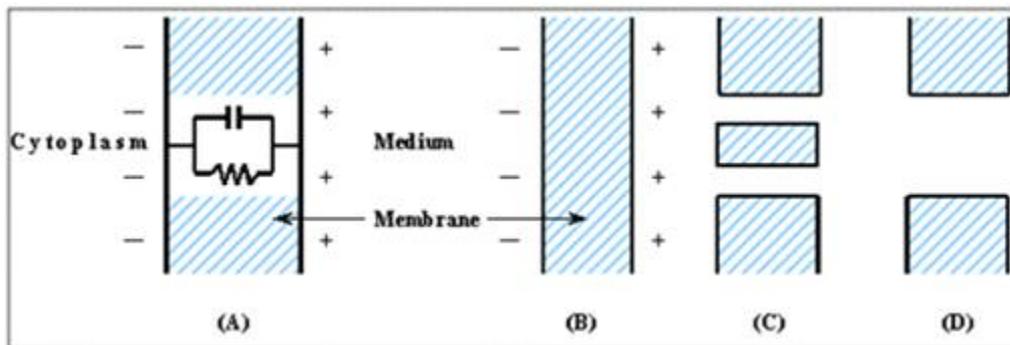


Fig 111. Electroporation of cell membrane due to compression when exposed to high intensity electric fields. (A) in the absence of electric field $E=0$; (B) in the presence of electric field $E < E_c$; (C) in the presence of electric field $E > E_c$; (D) in the presence of electric field $E \gg E_c$ (E_c represents the critical electric field)

2. 십자화과 식물의 펄스처리 조건 확립을 위한 세포막 붕괴도 측정 시스템 구축

가. 세포막 붕괴도의 간접적 측정 방법 : 펄스처리에 따른 이온 용출도 측정법

(1) 펄스전기장 처리로 인한 식물세포 내부구조 변화에 따른 이온 용출도 측정

- 식물성 원료에 0.5~3 kV/cm 펄스 전기장의 적용은 세포막에 불안전성과 압력을 가져

오게 되고 그에 따라 세포막에 선택적 붕괴가 일어나게 됨. 세포막이 붕괴된 상태이므로 세포막 내외로 열전달 및 물질전달 속도가 급격히 증가하며 이온의 용출 또한 증가하게 됨.

(2) 기존 연구를 바탕으로 한 이온 용출도 측정 방법 구축

- 기존 연구 결과에 따르면 대상물에 펄스 전기장 처리 강도가 거칠 수 록 이온의 용출 정도가 증가하는 것을 보여줌. 처리하는 Field strength (kV/cm), Pulse number(μs)가 세포에서 용출되는 이온의 양에 영향을 줌(Fig 112).
- 세포가 손상이 되면서 증가된 이온의 용출된 양은 물을 매개로 하여 Conductivity meter를 이용하여 측정을 함.

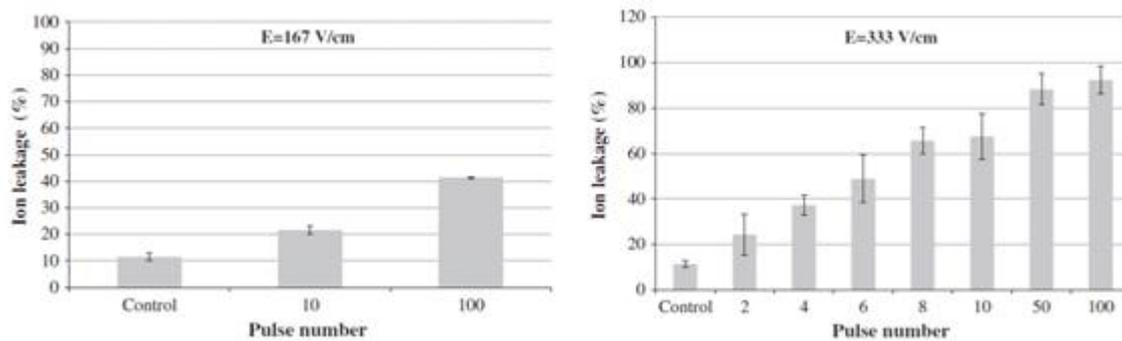


Fig 112. 펄스 전기장 처리에 따른 양과로부터의 이온 성분 용출 연구 결과 (Afetr Ersus, S. and D. M. Barrett (2010). "Determination of membrane integrity in onion tissues treated by pulsed electric fields: Use of microscopic images and ion leakage measurements." InnovativeFoodScience&EmergingTechnologies11(4): 598-603.)

나. Biological conductivity spectrometer 측정을 통한 세포막 붕괴 측정

(1) 전기화학적 방법을 통해 펄스전기장 처리에 따른 세포막 붕괴도 측정

- 펄스전기장 처리를 통해 생성된 세포막 전위차 (Trans-membrane potential, TMP)에 의한 electro-compressive force가 세포막의 부분적 파열을 유도하는데 그로 인해 세포막의 선택적 붕괴가 일어남. 펄스전기장에 의한 세포막의 선택적 붕괴는 다양한 식품원료에 적용가능하다. 식물성 시료의 경우, 곡류, 두류, 야채, 과일 등 각각의 종류에 따라 포함된 세포의 크기와 포함된 수분의 양과 조성이 다름.

- 다양한 식품원료에 펄스전기장을 처리해 그에 따라 발생하는 세포막의 선택적 붕괴를 확인하기 위한 전기화학적 방법으로 LCR meter를 이용하여 식품의 전기 전도도를 측정하는 방법을 구축하였음.

(2) Biological conductivity spectrometer를 이용한 기존의 연구 결과

- 세포가 파괴된 정도를 측정하기 위해 Biological conductivity spectrometer를 이용한 기존의 연구결과를 보면 다양한 frequency에서 식품원료내의 전기가 통하는 정도를 측정하는 방법을 사용하였음.
- 기존연구에서 발췌한 Fig 113의 결과를 보면, 감자를 처리하는 방법에 따라 Biological conductivity spectrometer를 이용하여 Electrical conductivity [S/m]를 측정한 기존 논문에서 연구된 결과임. 정상상태의 감자의 경우 낮은 Frequency 영역부터 높은 Frequency 영역까지의 Electrical conductivity [S/m] 값에 경향을 보면 처음에는 0에 가까운 낮은 Electrical conductivity 값을 가지다가 10 kHz부터 1 MHz 까지 급증하며 1 MHz 영역이상부터 값이 일정해지는 경향이 나타남. 반면 시료를 처리하는 강도에 따라 세포의 파괴된 정도가 커짐에 따라서 낮은 Frequency 영역에서도 Electrical conductivity [S/m]값이 높은 것을 확인할 수 있음. freeze-thaw method으로 totally ruptured potato의 경우 모든 frequency 영역에서 높은 Electrical conductivity [S/m] 값을 가지는 것을 관찰하였음. 이 결과를 통해 감자 세포가 완전히 파괴되었다는 것을 전기화학적 방법으로 간접적으로 확인 할 수 있음.
- Low frequency 영역의 Electrical conductivity [S/m] 값과 High frequency 영역의 Electrical conductivity [S/m] 값을 가지고 Cell disintegration index 값을 측정 할 수 있음(Fig 113). 세포가 붕괴된 정도가 커질 수록 Cell disintegration index값도 비례적으로 커지며 값의 영역은 0부터 1까지임.

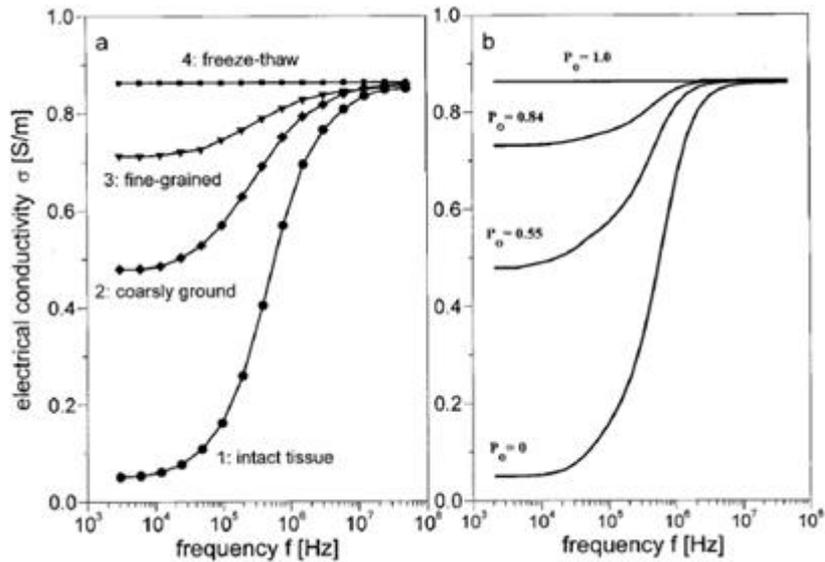


Fig 113. Frequency 영역에 따른 Electrical conductivity [S/m] 와 Cell disintegration index (After Alexander Angersbach, Volker Heinz, and Dietrich Knorr (1999). "Electrophysiological Model of Intact and Processed Plant Tissues." 753-762)

(3) Biological impedance spectrometer(LCR meter)를 통한 세포막 붕괴의 전기화학적 측정

- 펄스전기장 처리에 따라 세포막이 붕괴되었는지를 확인하기 위해서는 LCR meter를 이용하여 다양한 frequency에서 미세전류의 전기 전도도를 측정하는 전기 화학적 방법을 사용하였음(Fig 114).
- 실험에 사용된 LCR meter (LCR-8000G)는 20 Hz의 낮은 frequency부터 10 MHz의 높은 frequency 영역까지의 Impedance (Z), Admittance (Y)등을 측정할 수 있음(Table 64).



Fig 114. 펄스 처리 시료의 전기 화학적 측정을 위해 본 시험에 사용한 LCR-8000G

Table 64. The major specifications of the LCR meter

| | | |
|--------------------------|---|-----------------|
| Performance | 20Hz ~ 10MHz wide test frequency | |
| | 6 digital measurement resolution | |
| | 10mV ~ 2V measurement drive level | |
| | 0.1% basic measurement accuracy | |
| Operation | Spot frequency measurement | |
| | Actual measurement value display | |
| | Graph mode for easy adjustment of variable components | |
| | Large LCD display | |
| Measurement items | Capacitance (C) | Inductance (L) |
| | Reactance (X) | Susceptance (B) |
| | Impedance (Z) | Admittance (Y) |
| | DC Resistance | |

다. 식물세포 염색법을 통한 생화학적 세포붕괴도 측정

(1) 생화학적 방법을 통해 펄스전기장 처리에 따른 세포막 붕괴도 측정

- 펄스전기장 처리가 식물세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 염색을 통해 세포가 손상된 정도를 관찰함. 세포 염색을 통해 세포가 손상된 정도를 파악하며 가시적으로 결과를 확인 할 수 있음.

(2) 세포 손상에 따른 식물세포 염색 기존 연구 결과

- 기존 논문에서 발표한 생화학적 방법에 따르면 세포에 염색을 함으로써 식물세포가 붕괴되었는지 온전한 상태인지 Microscope를 이용하여 확인할 수 있음.
- Reference 논문에서 식물세포를 염색하는데 사용한 염료는 Neutral red(NR)임. Neutral red(NR)는 식물 내에 있는 액포에 축적되는 성질을 가지는 염료로써 정상상태의 세포에는 온전한 붉은 색으로 염색이 되며 세포가 손상되어 inviable 한 상태가 되면 염료가 축적되지 못하게 됨.
- 기존의 연구 논문에 따르면 0.2 M mannitol - 0.01 M MHEPES buffer로 pH 7.8로 맞춘 뒤 aqueous neutral red를 0.04%로 희석해 염료를 만들고, Pulsed electric field equipment (Top chamber : 2 cm diameter, Bottom : 0.3 cm deep) 로 전기처리를 해 줌. 양파에 처리하는 펄스전기장의 펄스 수가 많아질수록 Neutral red (NR) 염료가 양파 액포에 축적되지 않은 것을 확인 할 수 있음(Fig 115).

| Treatment | Parenchyma Cells | | Vascular Bundles and Outer Epidemis Cells | |
|------------------|------------------|--|---|--|
| Control | | | | |
| 333V/cm-2 pulse | | | | |
| 333 V/cm-4 pulse | | | | |
| 333 V/cm-6 pulse | | | | |
| 333 V/cm-8 pulse | | | | |

Fig 115 양파를 이용한 생화학적 세포손상도 측정 (After Ersus, S. and D. M. Barrett (2010). "Determination of membrane integrity in onion tissues treated by pulsed electric fields: Use of microscopic images and ion leakage measurements." Innovative Food Science & Emerging Technologies 11(4): 598-603)

(3) Neutral red (NR)를 이용한 양파 시료 관찰

- 펄스전기장 처리가 식물세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 염색을 통해 세포가 손상된 정도를 관찰하였음. 0.5% aqueous neutral red 60 μ l : 0.2 M mannitol - 0.01 M MHEPES buffer, pH 7.8, 1 mL 의 비율로 희석시킴. 처리 방법으로 나눈 양파를 두께 약 500 μ m로 sampling 한 뒤 2시간동안 염색을 시키고 Optical microscope (Dino lite, DINO, Taiwan)를 이용하여 세포를 관찰하였음(Fig 116).
- 양파로 실험을 했을 때 손상이 되지 않은 세포의 경우 Neutral red 염료가 세포에 염색이 되지만 Freeze-thaw 하여 세포를 Totally rupture 시키면 세포에 염료가 축적이 되지 못하는 것을 확인하였음(Fig 116).

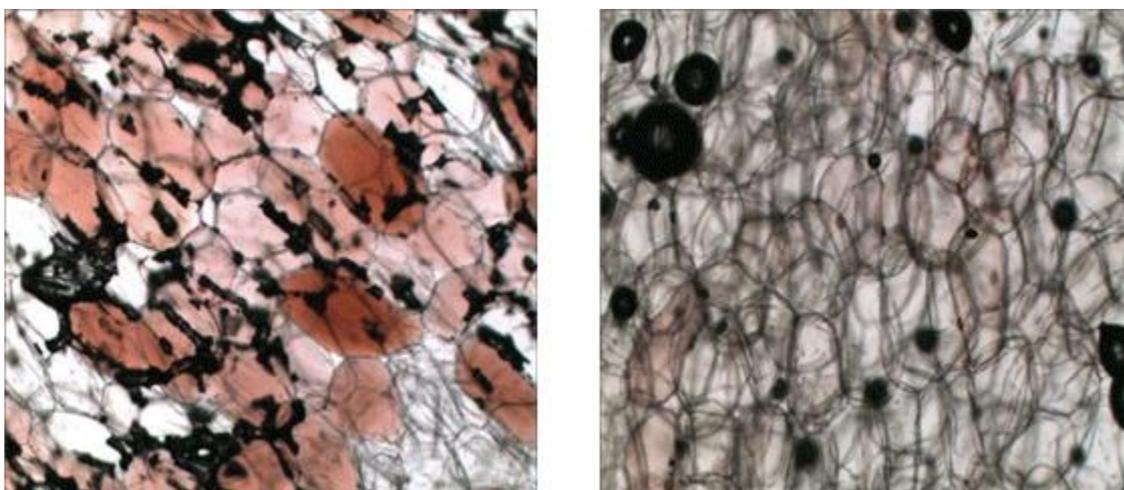


Fig 116. 세포손상에 따른 Neutral red 염료의 축적 정도; 정상상태 (그림 좌); Freeze-thaw 하여 Totally rupture 된 양파 (그림 우)

(4) 세포벽 손상도 확인을 위한 염색 측정법

- 식물세포의 세포벽의 경우 Pectin과 셀룰로오스로 구성이 되어있음. Ruthenium red 의 경우 Pectin과 결합하는 성질이 있어 세포벽을 관찰할 수 있음. Referance 논문에 따르면 감자를 두께 30 μ m로 처리한 뒤 Dry content 50%의 Ruthenium red 20 μ l로 염색한 뒤 microscope로 관찰함.
- 이전 논문에서 발표한 결과를 보면 펄스전기장 처리한 감자의 세포벽에 경우 약간의 변화가 나타남(Fig. 117).

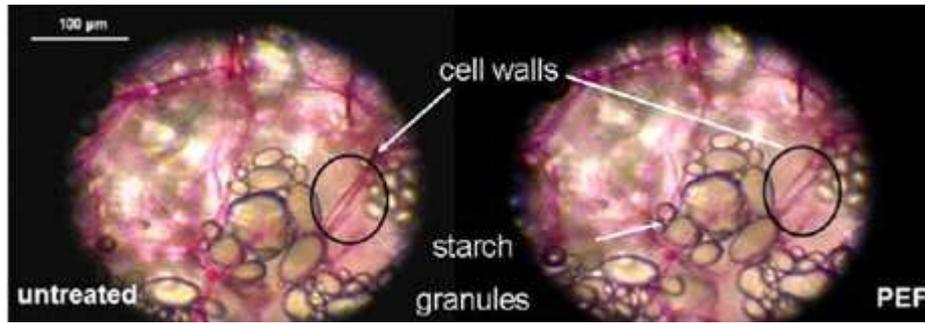


Fig 117. 세포염색법에 의한 감자의 세포벽 관찰 (Janositz, A., A. K. Noack, et al. (2011) (After "Pulsed electric fields and their impact on the diffusion characteristics of potato slices." *LWT-FoodScienceandTechnology* **44**(9): 1939-1945)

○ 분말형태의 Ruthenium red 염료를 물에 희석하여 무 절편에 염색한 뒤 Optical microscope (Dino lite, DINO, Taiwan)로 관찰하였으며 기존 연구결과와 유사한 세포벽 구조를 확인하였음(Fig. 118).

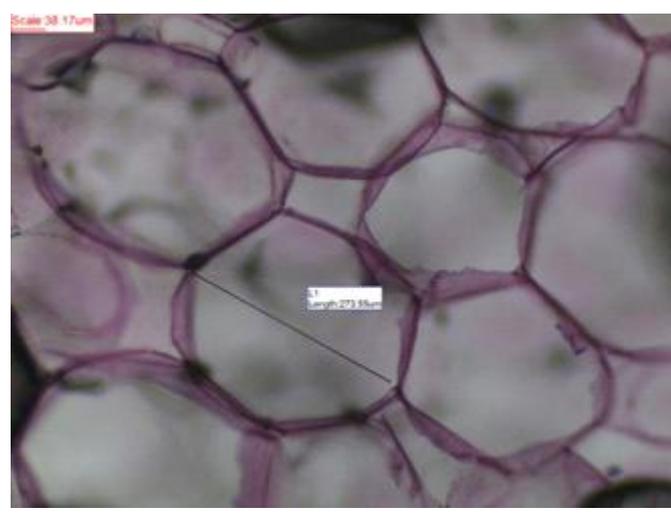


Fig 118. Ruthenium red 염료로 염색한 무세포의 세포벽

3. Myrosinase activity 측정 시스템 구축

가. Go assay kit를 이용한 측정 방법 : 흡광도 측정법

(1) Myrosinase activity 측정 기존 연구 결과

○ Myrosinase는 식물체 중의 글리코시드결합을 끊는 효소로서 보통 때는 분리되어 있다

가 같거나 다지는 등의 조리과정을 거치면 세포가 파괴되어 전구체와 반응을 함. 또한 이형세포 내에 있던 미로시나아제의 작용으로 자극적인 냄새와 매운맛을 냄. Myrosinase는 효소이기 때문에 가공과정에서 변성이 일어날 수도 있음. 펄스전기장 처리가 Myrosinase 활성에 어떤 영향을 주는지 파악하기 위해 Go assay kit (Sigma-Aldrich)를 사용하여 Myrosinase 활성을 측정함. 이는 Myrosinase에 의해 전구체인 sinigrin과 반응하여 생성된 glucose를 측정하는 방법임.

- 기존 논문에서 발표한 결과를 따르면 무 뿌리를 시료로 선정하여 저장 기간에 따른 Myrosinase activity를 Go assay kit (Sigma-Aldrich)를 이용하여 측정하였음(Fig 119). 저장기간이 길어질수록 Myrosinase 활성이 감소하는 것을 확인 할 수 있음.

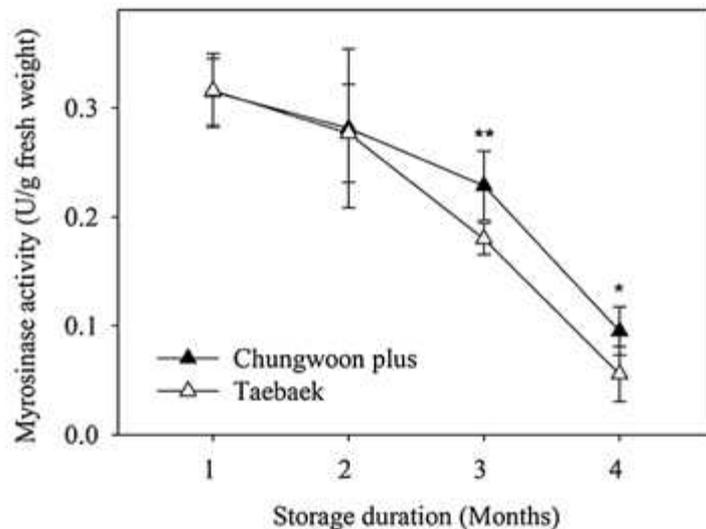


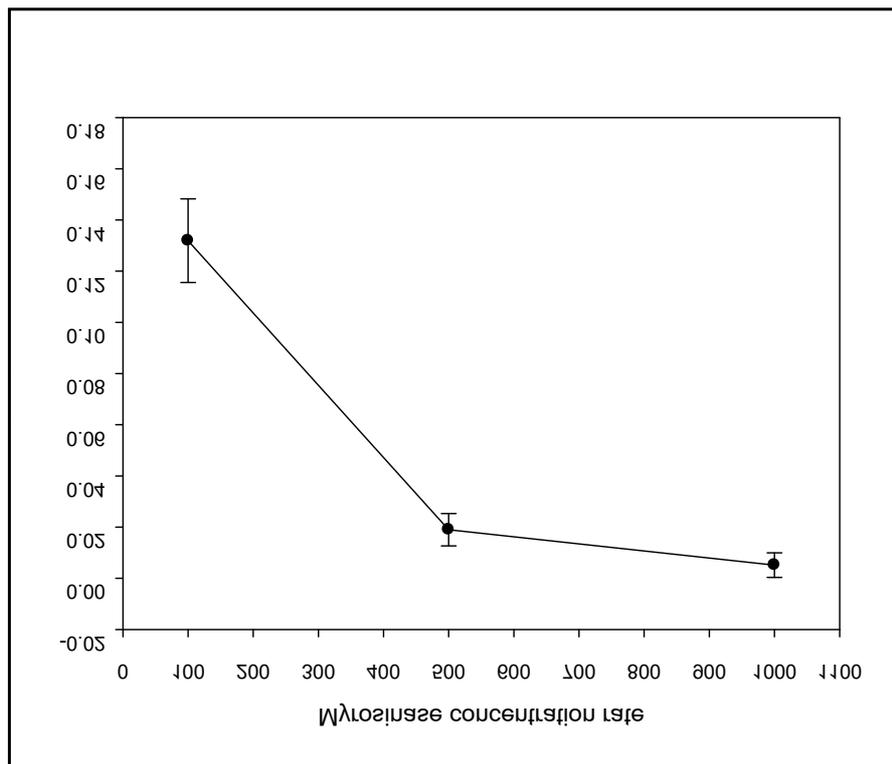
Fig 119. 무 뿌리의 저장 기간에 따른 Myrosinase activity 측정 (After Lim, S., E. J. Lee, et al. (2015). "Decreased sulforaphene concentration and reduced myrosinase activity of radish (*Raphanus sativus* L.) root during cold storage." Postharvest Biology and Technology 100: 219-225.)

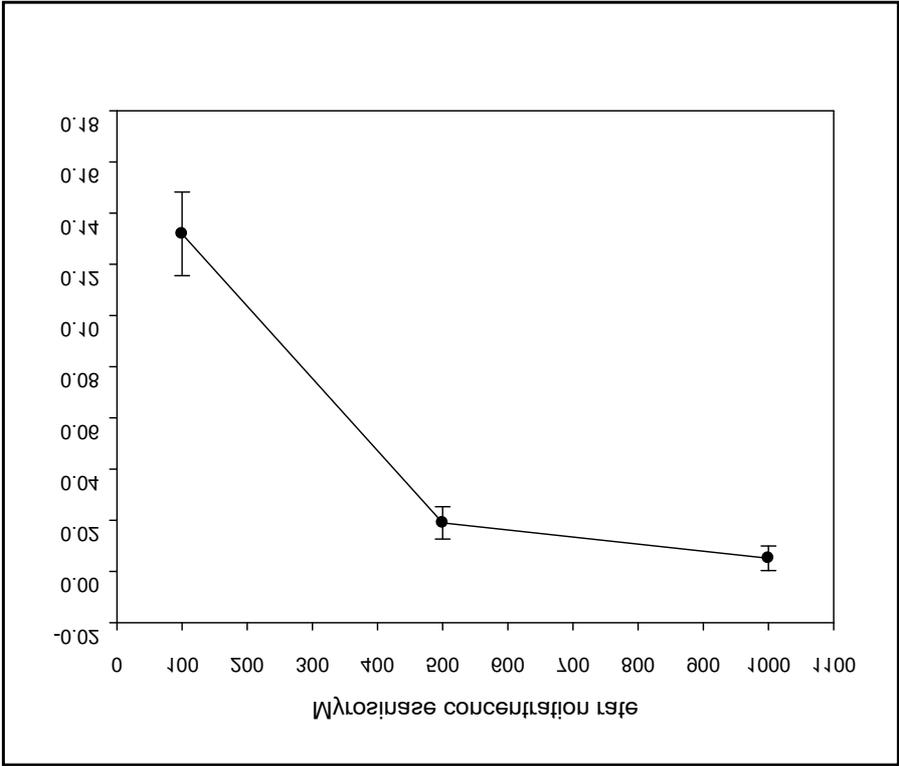
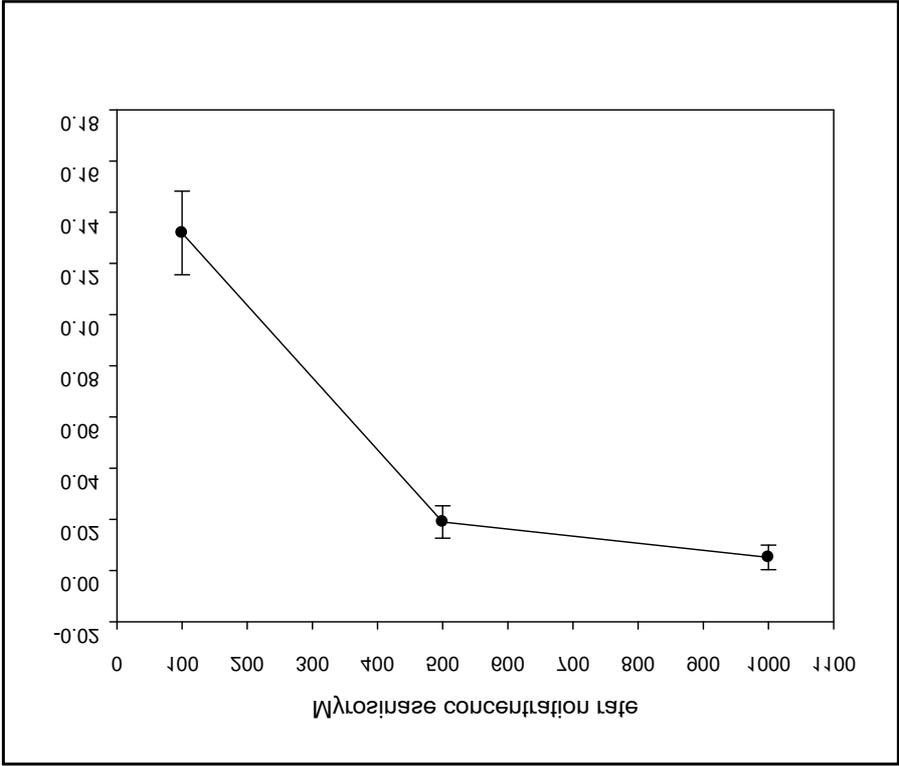
(2) Myrosinase activity 측정법

- Reference 논문에서 사용한 (-)-Sinigrin hydrate (Sigma 85440)를 전구체로 사용하였으며, Myrosinase는 Thioglucosidase from *Sinapis alba* (white mustard) seed (T4528, 25Unit)를 Sigma-Aldrich에서 구입하였음.
- 33.3mM Potassium phosphate buffer (pH 6.5) 800ul과 2mM sinigrin 100ul을 enzyme

100ul와 함께 섞어 37°C 에서 30분 동안 반응시켜 Glucose를 생성시킴. 30분간 반응이 끝나면 95°C Heating block에서 10분간 처리하여 반응을 중단시킴. 원심분리기를 이용하여 13500 rpm에서 20분간 원심분리 시키고 상등액을 취함.

- Standard curve를 만들기 위해 80 μ l 1mg/ml D-Glucose와 1920 μ l assay buffer를 합하여 총 볼륨 2.0mL의 stock solution을 제조한다. 96 well plate에 (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 2 μ g/50 μ l) 농도 별로 stock solution 과 Assay buffer를 농도에 맞추어 넣음.
- Myrosinase와 sinigrin 으로 인해 생성된 glucose를 측정하기 위해 Go assay kit를 이용함. glucose oxidase/peroxidase reagent 39.2ml 와 o-Dianisidin reagent 0.8ml 를 섞어 Mixture reagent를 제조함. 각 well에 50 μ l의 sample을 넣고 10초간의 interval을 주면서 Mixture reagent를 넣어줌. 30분간 37°C incubator에서 반응시킴. 반응을 중단시키기 위해 12N H2SO4를 100ul씩 각 well 에 interval을 주면서 넣어줌. 540nm에서 micro-plate reader를 이용하여 흡광도를 측정함.
- Myrosinase의 반응농도를 맞추기 위해 Thioglucosidase from *Sinapis alba* (white mustard) seed (25Unit)를 100배 500배 1000배 희석하여 흡광도를 측정하였음(Fig 120). 100배로 희석한 Myrosinase가 Standard curve 범위 안에 적격히 들어간다고 판단하여 실험에서는 100배 희석한 Myrosinase를 사용하였음.





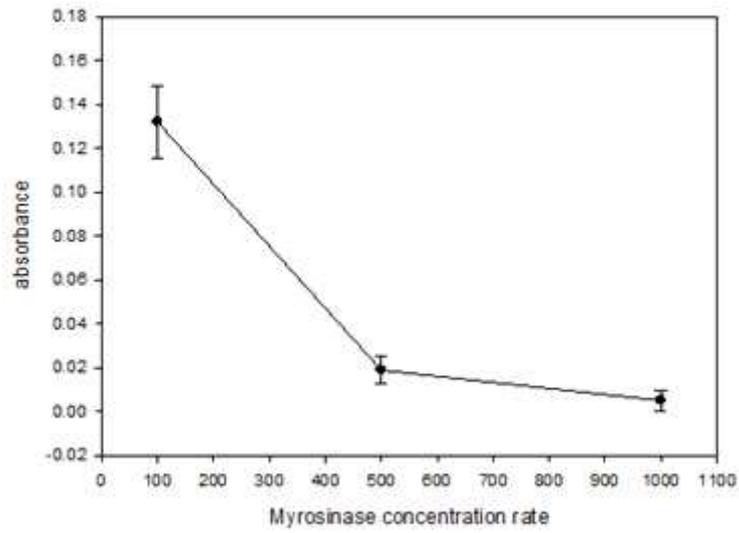
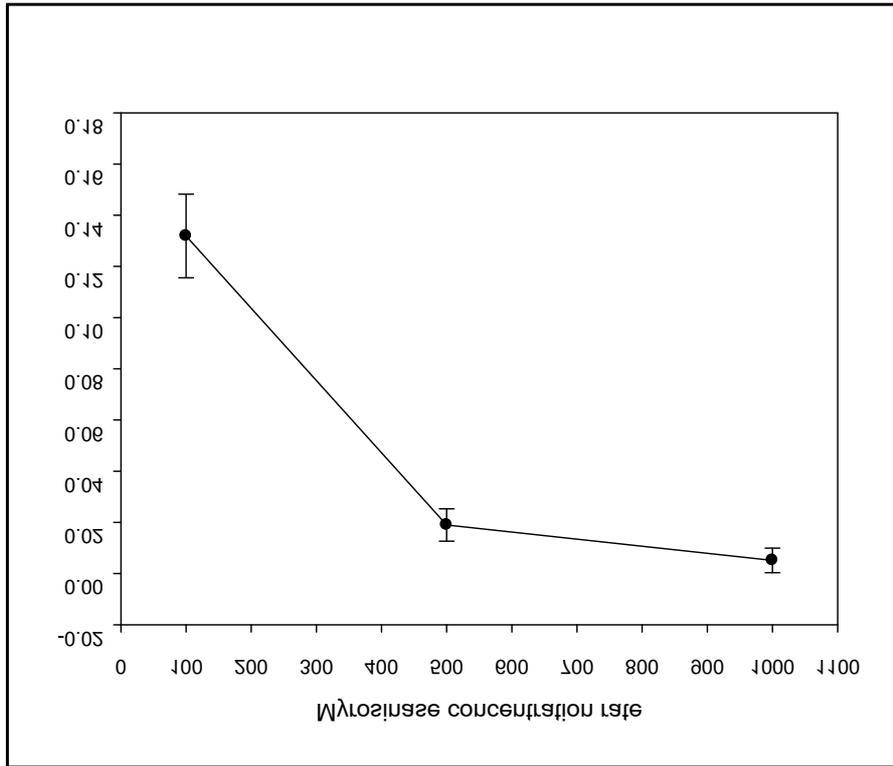


Fig 120. Myrosinase 희석배율에 따른 흡광도 측정

4. 세포구조 검증을 이용한 식물조직별 펄스 처리 가공특성 검증

가. 십자화과 식물 중 무의 펄스처리 및 세포 구조 변화 측정

(1) 펄스처리를 통해 무로부터의 이온 Leaching 변화 측정

- 선별된 무를 사용하여 일정크기로 sampling 한 뒤 펄스전기장 처리를 하였음(Table 65). 펄스 처리한 무와 정상상태의 대조군을 증류수 250 ml에 침지시켜 총 6시간동안 용액 내의 Conductivity를 측정하였음(Fig 121).
- 무의 경우 정상상태 대조군은 6시간이 지나도 용액 중 이온 농도의 차가 크지 않음을 확인하였음. 0.5 kV/cm 펄스전기장 처리한 무의 경우 1 kV/cm, 1.5 kV/cm, 2 kV/cm, 2.5 kV/cm 처리한 무보다 용액중 이온의 농도가 낮으며 컨트롤과 측정값의 차이가 없었음. 이는 0.5 kV/cm로 처리한 무의 세포손상도가 적다는 것을 의미함. 또한 1, 1.5, 2, 2.5 kV/cm 순서로 펄스 전기장 세기에 비례하여 수용액 안의 이온농도가 증가하고 있음을 확인할 수 있음.

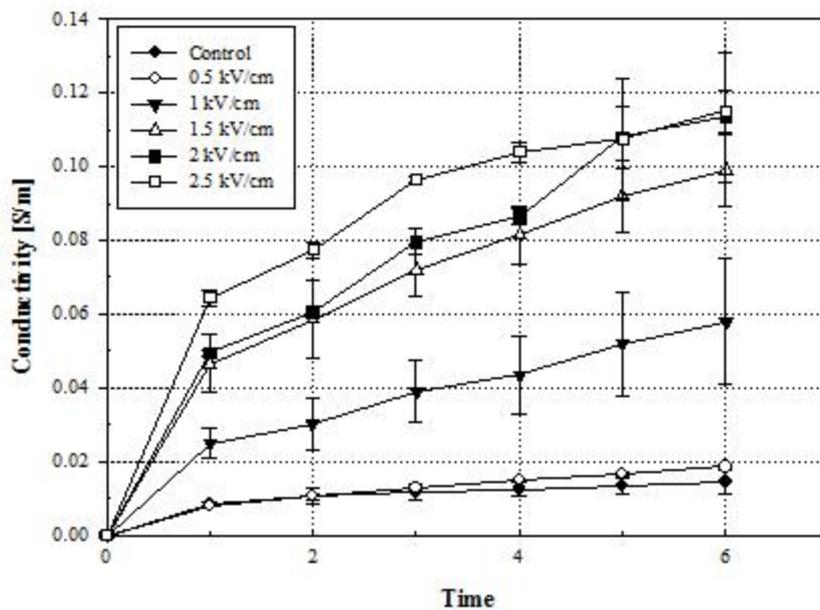


Fig 121. 펄스전기장 처리에 따른 무로부터의 이온성분 용출

Table 65. 무 펄스전기장 처리 조건

| Field strength (kV/cm) | Out voltage (%) | Pulse width (μ s) | Frequency (Hz) | Time (second) |
|---------------------------|--------------------|---------------------------|-------------------|------------------|
| 0.5 | 12 | 30 | 100 | 3 |
| 1 | 24 | 30 | 100 | 3 |
| 1.5 | 36 | 30 | 100 | 3 |
| 2 | 46 | 30 | 100 | 3 |
| 2.5 | 56 | 30 | 100 | 3 |

(2) Biological conductivity spectrometer 측정 통한 무의 가공특성 검증

- 펄스전기장 처리가 식물 세포막을 손상하여 식물세포 내부의 Conductivity를 증가시켜 주는 것을 넓은 Hz 영역에서 측정하였음. 무의 경우 펄스전기장 처리를 한 뒤 지름 1 cm, 높이 1 cm 원통형으로 Sampling 한 뒤 LCR meter를 이용하여 Electrical conductivity를 측정하였음(Fig 122).
- 정상상태 무의 경우 1 kHz부터 10 kHz 까지 Electric conductivity 값이 일정하다가 10 kHz부터 2 MHz 까지 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 반면에 펄스전기장 처리를 한 무의 경우에는 세포가 손상되어 세포질 안의 물질이 터져 나와 세포 내부의 Electric conductivity가 증가하여 낮은 영역의 Hz에서도 정상상태의 무보다 Electric conductivity가 높게 나타나는 것을 알 수 있음.
- 1 kHz부터 2 kHz 까지 측정한 값의 경향을 보면 Hz가 높아질수록, 펄스 전기장 세기가 증가할수록 비례하여 Electric conductivity 가 증가하는 것을 확인하였음. 0.5 kV/cm, 1 kV/cm 까지는 비슷한 값이 측정되지만 1.5 kV/cm, 2 kV/cm, 2.5 kV/cm 의 Field strength 에서는 세포의 붕괴 정도가 크다는 것을 알 수 있음.
- 펄스 전기장 처리에 따른 세포 손상도를 수량화하기 위해 The conductivity disintegration index Z 값을 이용하여 비교하였음<수식 1>. Electrical value는 Low frequency (1-5 kHz) 의 Electric conductivity를 나타냄.

$$\text{index } Z = \frac{\text{electrical value at 2kHz} - \text{intact tissue electrical value}}{\text{totally destroyed tissue electrical value} - \text{intact tissue electrical value}} \quad (1)$$

- 0.5 kV/cm, 1 kV/cm, 1.5 kV/cm, 2 kV/cm, 2.5 kV/cm로 처리한 Conductivity disintegration index Z 값은 각각 0.0146, 0.0544, 0.3245, 0.4293, 0.4485 으로 증가하는

것을 알 수 있음(Fig. 122). 이는 펄스 전기장의 세기가 증가할수록 세포 손상된 정도가 증가한다는 것을 의미함.

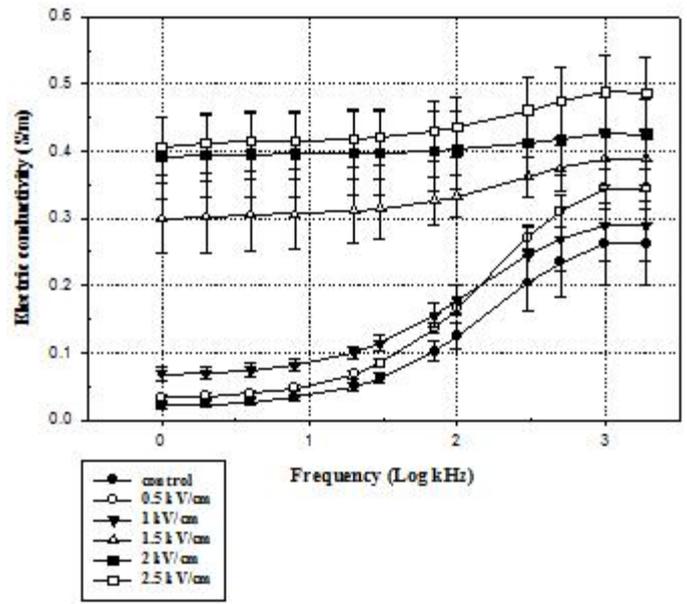


Fig 122. Biological conductivity spectrometer 를 이용하여 무의 Electric conductivity 측정

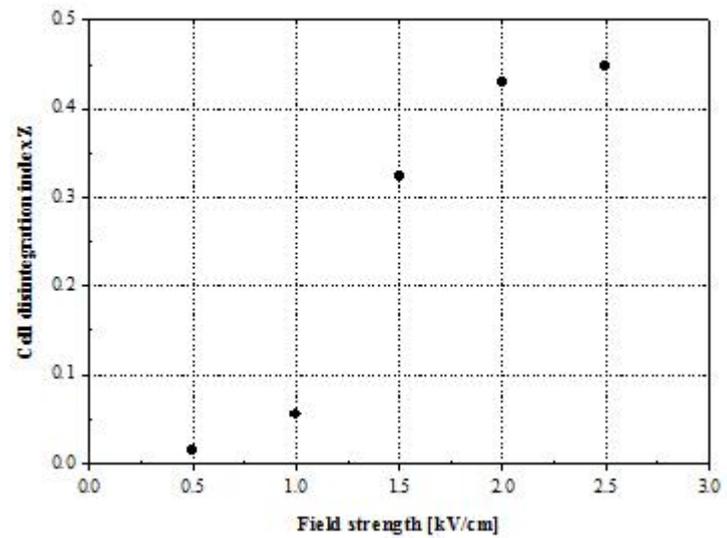


Fig 123. 무의 The conductivity disintegration index Z값 측정

(3) 염료를 이용한 염색을 통해 무의 펄스 처리 가공특성 검증

- 일정 크기의 무를 1 kV/cm, 2 kV/cm, 100 Hz 의 펄스 전기장 하에서 각 3초 간 처리한 뒤 Hand microtome을 이용해 두께 약 500 μ m Sampling하고 0.5% aqueous neutral red 60 μ l : 0.2 M mannitol - 0.01 M MHEPES buffer, pH 7.8, 1 mL 의 비율로 희석시킨 염료를 2시간동안 염색시킴.
- 펄스 처리를 하지 않은 정상상태 무는 염료가 세포에 축적이 되어 붉은색으로 염색이 된 것을 확인할 수 있음. 염색하기 위해서는 얇은 절편을 만들어야 하는데 이 과정 중 세포가 손상이 되어 대조군 무에서 염색이 되지 않은 부분이 나타났음(Fig 124-1). 반면 펄스 전기장 처리를 한 무의 경우 세포가 손상 되어 염료가 축적되지 못한 것을 확인할 수 있음(Fig. 124-2).

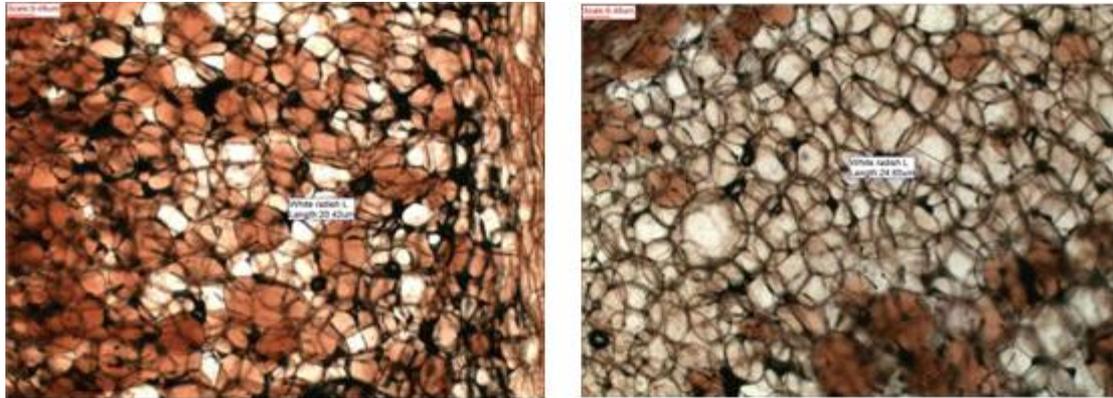


Fig 124-1. 무 세포 염색을 통한 펄스 전기장 가공특성 검증; 정상상태 무 (사진 좌); 1 kV/cm 펄스 전기장 처리 (사진 우);

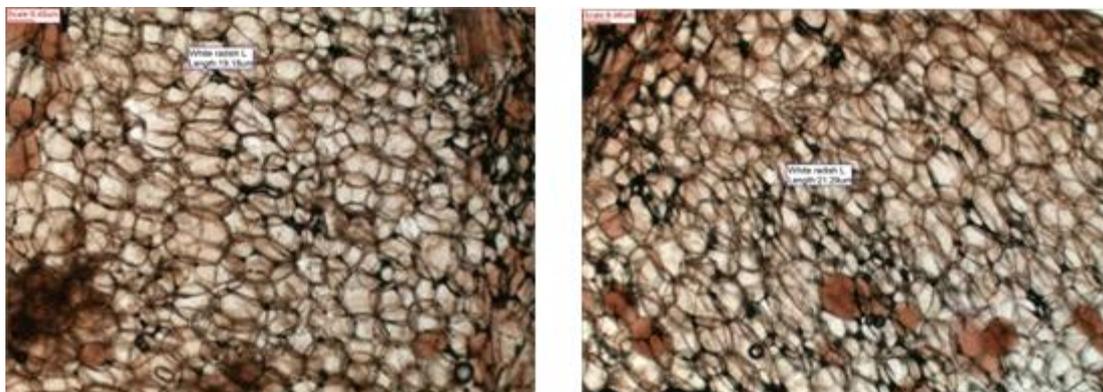


Fig. 124-2. 무 세포 염색을 통한 펄스 전기장 가공특성 검증; 2 kV/cm 펄스 전기장 처리 (사진 좌, 우)

○ 식물세포에 펄스 전기장 처리를 하여 세포벽에 미치는 영향을 보기 위해 일정 크기의 무를 1 kV/cm, 2 kV/cm, 100Hz 의 펄스 전기장 하에서 3초간 처리를 하였음. 그 뒤에 얇은 절편으로 만들어 ruthenium red 가루를 물에 희석하여 세포벽에 염색하였음. 대조군 무와 비교하여 펄스 전기장 처리한 무의 세포벽이 완전히 손상된 모습은 관찰할 수 없었음(Fig 125-1).

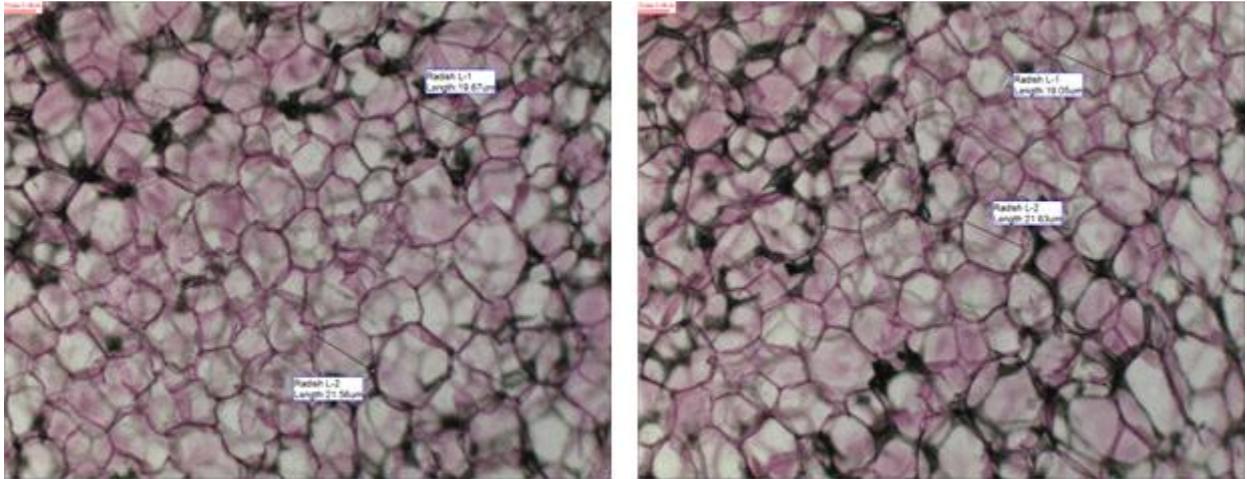


Fig. 125-1. 무 세포벽 염색을 통한 펄스 전기장 가공특성 검증; 정상상태 대조군 무 (사진 좌,우)

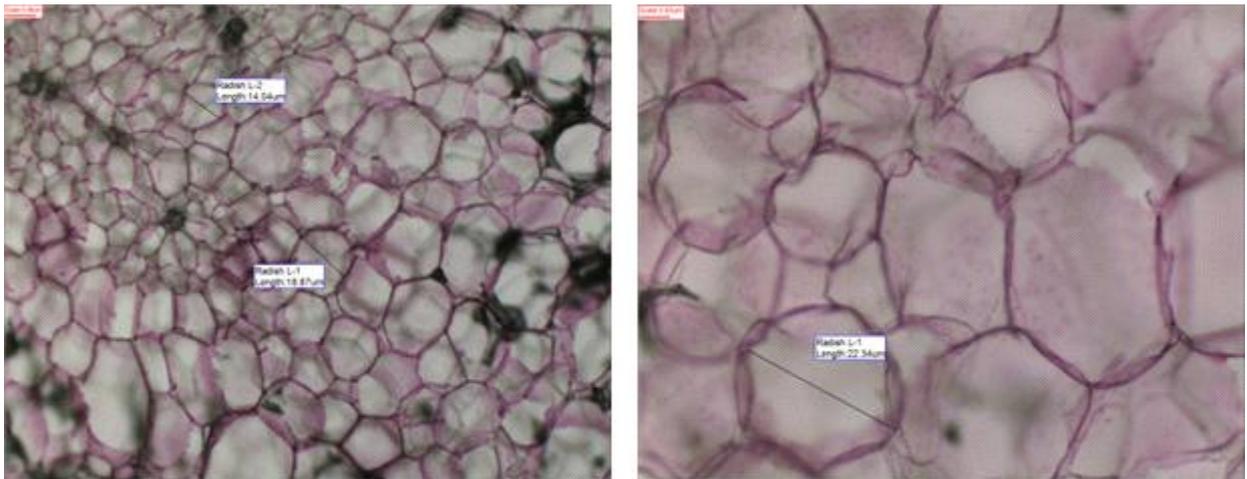


Fig. 125-2. 무 세포벽 염색을 통한 펄스 전기장 가공특성 검증; 1 kV/cm 펄스 전기장 처리 (사진 좌), 2kV/cm 펄스 전기장 처리 (사진 우)

나. 브로콜리의 펄스처리 및 세포 구조 변화 측정

(1) Biological conductivity spectrometer 측정을 통한 브로콜리의 가공특성 검증

- 정상상태 브로콜리와 1.5 kV/cm, 2.5 kV/cm 의 Field strength로 펄스전기장 처리한 브로콜리의 Electric conductivity의 차이는 거의 나타나지 않았음(Table 66, Fig 126). 펄스전기장 처리한 무와 비교하여 브로콜리 cell 의 크기가 더 작고 물성이 단단하기 때문에 같은 처리 조건에서 세포의 손상이 적은 것으로 판단됨.

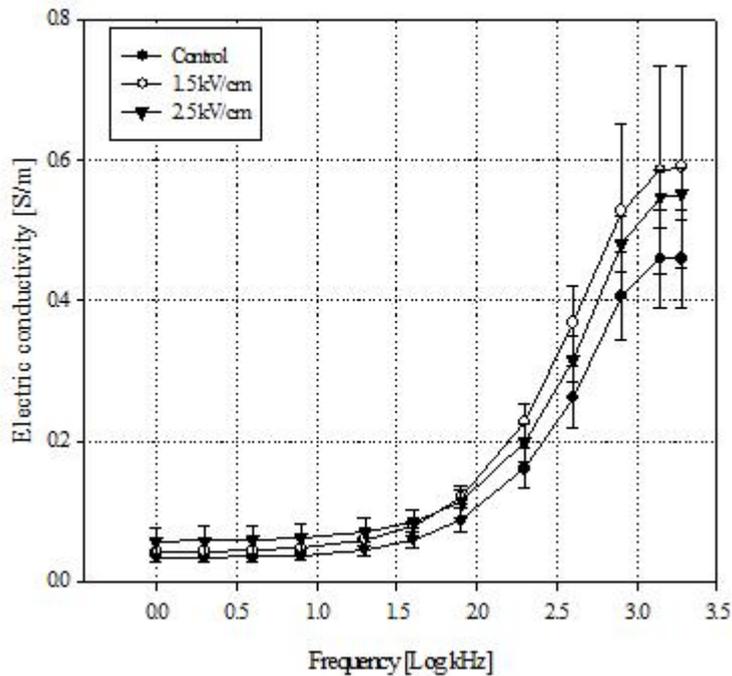


Fig 126. Biological conductivity spectrometer를 이용하여 브로콜리의 Electric conductivity 측정

Table 66. 브로콜리 펄스전기장 처리 조건

| Field strength (kV/cm) | Out voltage (%) | Pulse width (μ s) | Frequency (Hz) | Time (second) |
|---------------------------|--------------------|---------------------------|-------------------|------------------|
| 0.5 | 12 | 30 | 100 | 3 |
| 1 | 24 | 30 | 100 | 3 |
| 1.5 | 36 | 30 | 100 | 3 |
| 2 | 46 | 30 | 100 | 3 |
| 2.5 | 56 | 30 | 100 | 3 |

(2) 염료를 이용한 염색을 통해 브로콜리의 펄스 처리 가공특성 검증

- 일정 크기의 브로콜리를 1 kV/cm, 2 kV/cm, 100 Hz 의 펄스 전기장 하에서 각 3초 간 처리 한 뒤 Hand microtome을 이용해 두께 약 500 μ m로 Sampling 하고 0.5% aqueous neutral red 60 μ l : 0.2 M mannitol - 0.01 M MHEPES buffer, pH 7.8, 1 mL 의 비율로 희석시킨 염료를 2시간동안 염색시킴.
- 1 kV/cm 로 펄스전기장 처리한 브로콜리의 경우 염료의 축적된 정도가 control과 비교하여 큰 차이가 없음. 하지만 2 kV/cm로 처리한 브로콜리는 세포가 손상되어 염료의 축적이 감소한 것을 확인하였음(Fig 127).

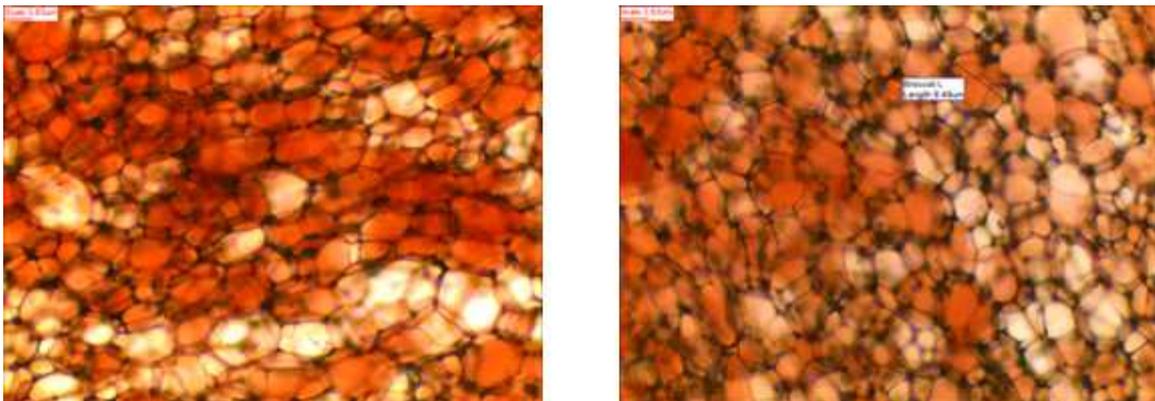


Fig 127-1. 브로콜리 세포 염색을 통한 펄스 전기장 가공특성 검증; 정상상태 무 (사진 좌,우)

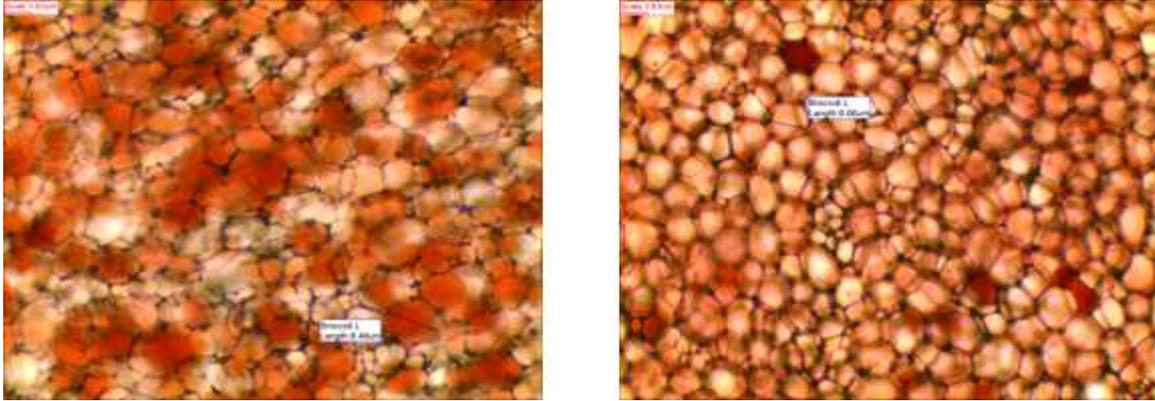


Fig 127-2. 브로콜리 세포 염색을 통한 펄스 전기장 가공특성 검증; 1 kV/cm 펄스 전기장 처리 (사진 좌); 2 kV/cm 펄스 전기장 처리 (사진 우);

○ 브로콜리를 Hand microtome을 이용하여 얇은 절편으로 만들어 ruthenium red 가루를 물로 희석하여 세포벽에 염색 하였음. 대조군 무와 비교하여 펄스 전기장 처리한 브로콜리의 세포벽의 차이는 확인할 수 없었음(Fig 128).

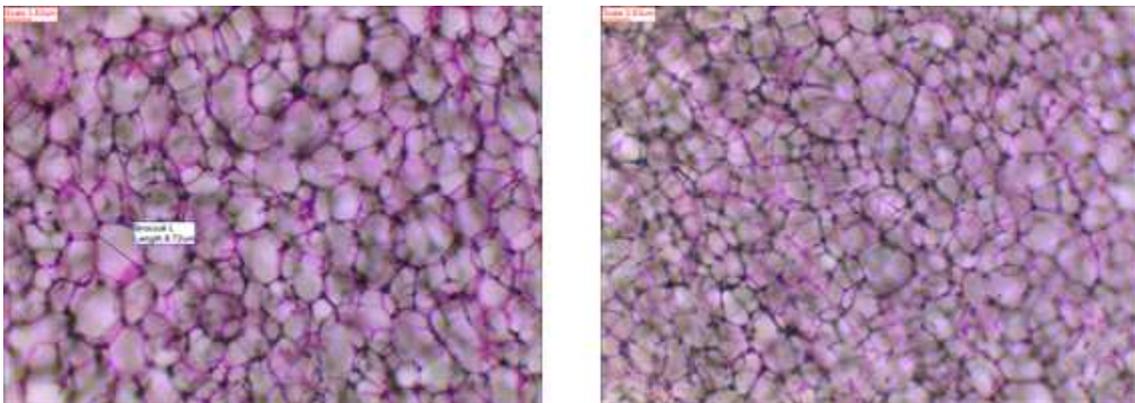


Fig 128-1. 브로콜리 세포 염색을 통한 펄스 전기장 가공특성 검증. 정상상태 브로콜리(사진 좌); 1 kV/cm 펄스 전기장 처리 (사진 우);

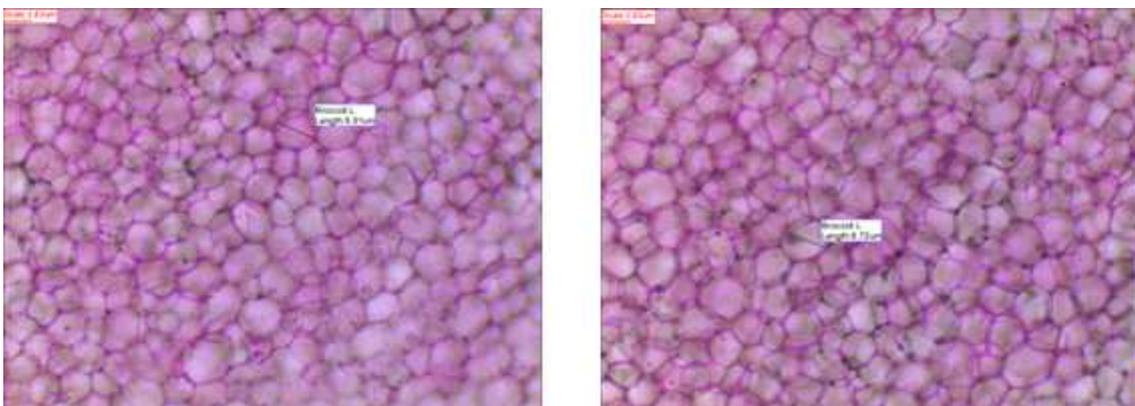


Fig 128-2. 브로콜리 세포 염색을 통한 펄스 전기장 가공특성 검증; 2 kV/cm 펄스 전기장 처리 (사진 좌, 우)

다. 무의 초고압 처리 및 세포 구조 변화 측정

(1) Biological conductivity spectrometer 측정을 통한 무의 초고압처리 가공특성 검증

- 일정 크기의 무를 350 MPa, 450 MPa의 조건으로 5분간 초고압 처리하였음. 정상상태 무의 경우는 1 kHz 부터 50 kHz 까지 frequency 영역에서 낮은 electric conductivity 값이 나타난 반면에 초고압 처리한 무의 경우에는 electric conductivity 값이 증가한 것을 확인하였음.
- 초고압 처리한 무는 1.5 kV/cm부터 2.5 kV/cm 까지 펄스전기장 처리한 electric conductivity 값과 비슷한 양상을 보였음. 이는 1.5 kV/cm부터 2.5 kV/cm 까지 펄스 전기장 처리한 무의 세포파괴도가 350 MPa, 450 MPa의 조건으로 5분간 초고압 처리한 세포 파괴도와 비슷하다는 것을 의미함.
- 350 MPa로 초고압 처리한 무는 모든 frequency 영역에서 0.3에서 0.4 사이의 일정한 값의 electric conductivity 값이 측정된 반면에 450 MPa로 처리한 1 kHz 부터 50 kHz 까지 frequency 영역에서는 350 MPa로 초고압 처리한 무보다 낮은 electric conductivity이 측정되다가 높은 frequency 영역에서 값이 증가하는 양상을 보였음(Fig 129).

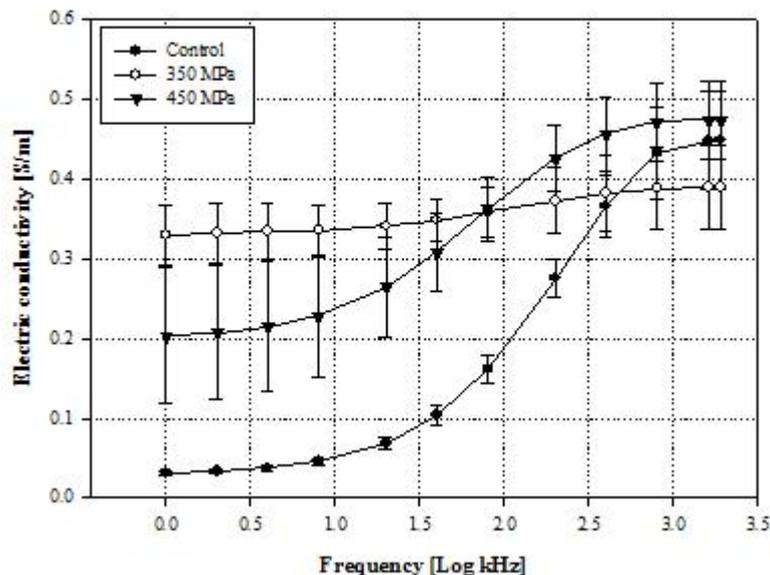


Fig 129. Biological conductivity spectrometer를 이용하여 초고압 처리한 무의 Electric conductivity 측정

(2) 염료를 이용한 염색을 통해 초고압처리 가공특성 검증

- 펄스전기장 처리와 동일한 사이즈의 일정 크기의 무를 350 MPa, 450 MPa의 조건으로 5분간 초고압 처리하였음. 그 뒤 Hand microtome을 이용해 두께 약 500 μ m Sampling 하고 0.5% aqueous neutral red 60 μ l : 0.2 M mannitol - 0.01 M MHEPES buffer, pH 7.8, 1 mL 의 비율로 희석시킨 염료를 2시간동안 염색시킴.
- 정상상태의 무의 경우 염료의 축적이 많아 세포 손상된 정도가 많지 않은 반면 350 MPa, 450 MPa 초고압 처리된 무는 세포가 손상되어 염료의 축적이 감소되었음(Fig 130).

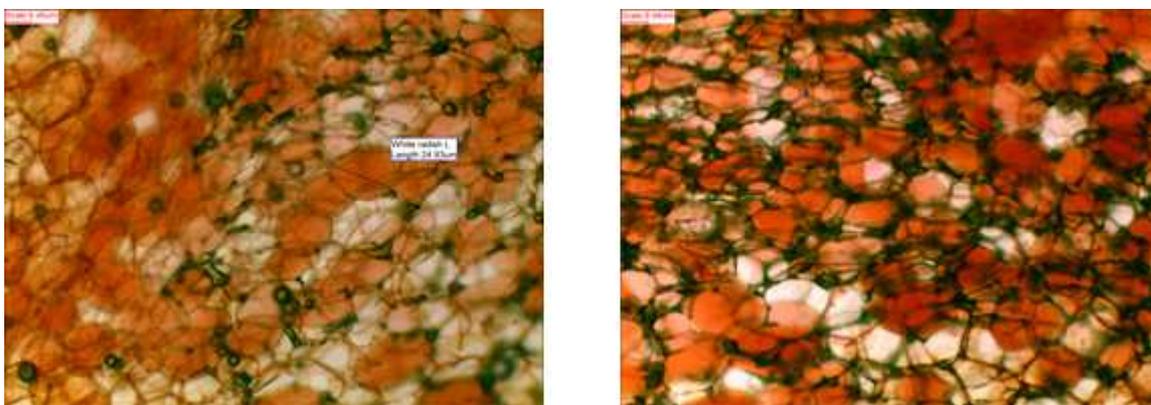


Fig 130-1. 무 세포 염색을 통한 초고압 처리 가공특성 검증; 정상상태 무 (사진 좌, 우)

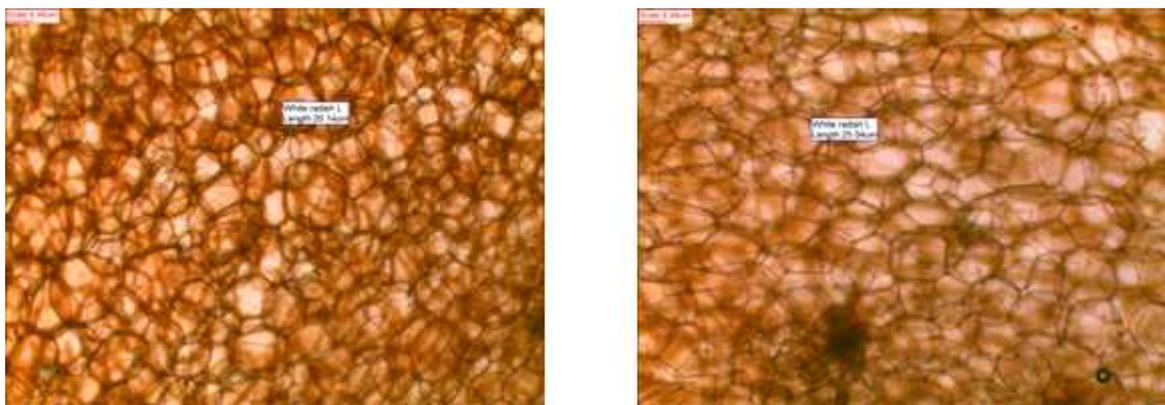


Fig 130-2. 무 세포 염색을 통한 초고압 처리 가공특성 검증; 350 MPa (사진 좌); 450 MPa (사진 우)

라. 무의 Ultra sound 처리 및 세포 구조 변화 측정

(1) Biological conductivity spectrometer 측정을 통한 Ultra sound 처리 가공특성 검증

- 일정크기의 선별된 무를 Ultra sound (30 second, 3min, 5 min)처리 한 뒤 지름 1 cm, 높이 1 cm 원통형으로 Sampling 하고 LCR meter를 이용하여 Electrical conductivity 를 측정하였음(Fig. 25).
- 정상상태 무와 Ultra sound (30 second, 3min, 5 min) 처리한 무의 Electric conductivity 차이는 차이가 없었다. 이는 펄스전기장과 다르게 Ultra sound 처리가 무 세포에 영향을 안준다는 것을 의미함. Cell disintegration index z 값의 차이 또한 없었음.
- Ultra sound 처리에 따른 무세포의 손상된 정도를 염색을 통해 관찰하였을 때 정상상태 무와 Ultra sound 30초, 3분, 5분 처리한 무와의 차이는 확인하지 못했다 (Fig. 26). 펄스전기장 처리와 비교하여 세포 손상된 정도가 낮다는 것을 의미함.

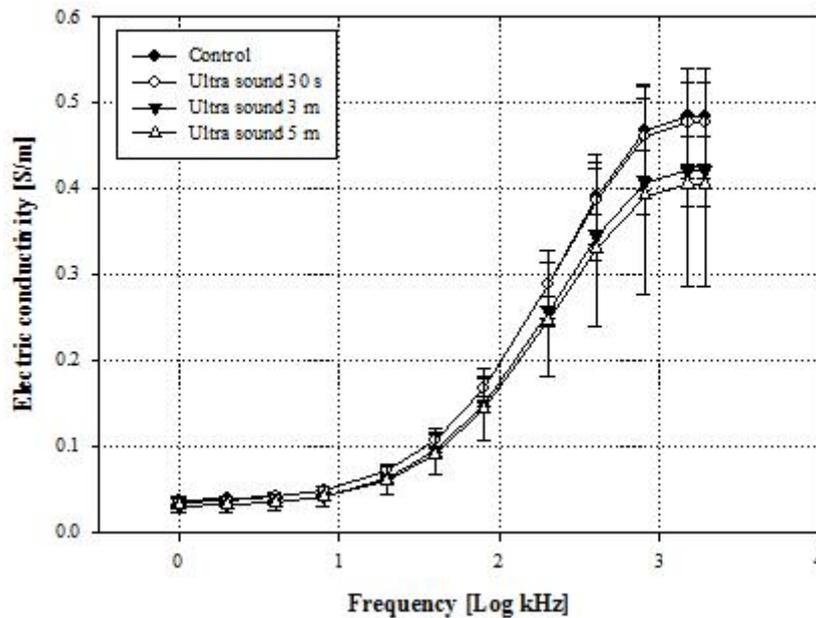


Fig 131. Biological conductivity spectrometer를 이용하여 Ultra sound 처리한 무의 Electric conductivity 측정

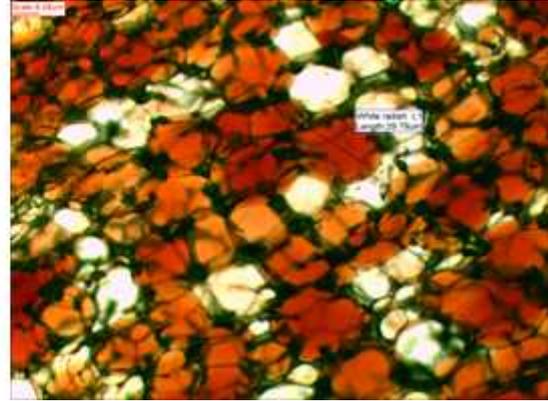
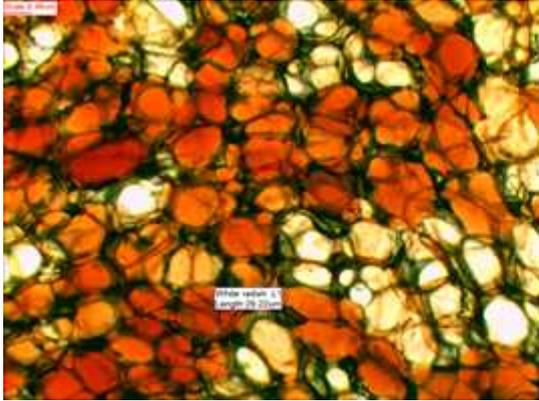


Fig 132-1. 무 세포 염색을 통한 Ultra sound 가공특성 검증. 정상상태 무 (사진 좌)
Ultra sound 30 second 처리 (사진 우)

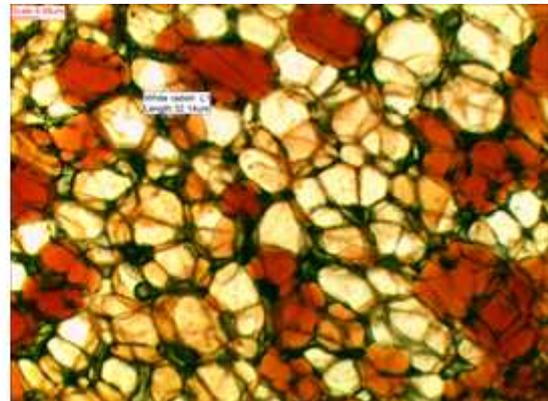
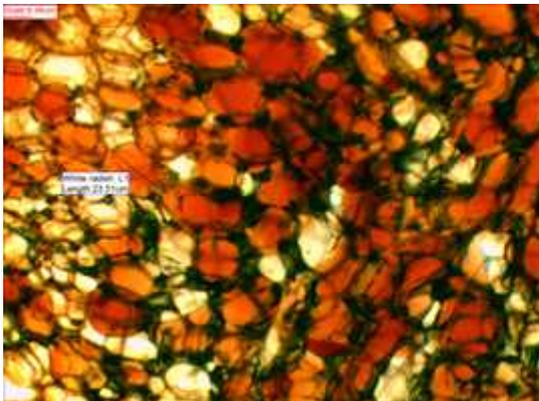


Fig 132-2. Ultra sound 3분 처리 (사진 좌), Ultra sound 5분 처리 (사진 우)

5. 펄스전기장 및 처리방법별 Myrosinase 활성도 측정

가. 펄스전기장 처리에 따른 myrosinase 활성 측정

- 100배 희석한 myrosinase 원액을 2 mm PEF chamber에 넣고 2.4 kV/cm, 3 kV/cm, 3.6 kV/cm (Pulse number 100) 3가지 조건으로 처리하였음.
- 처리하지 않은 정상상태의 myrosinase의 활성은 0.5 이고 2.4 kV/cm, 3 kV/cm, 3.6 kV/cm (Pulse number 100) 처리한 myrosinase의 활성은 각각 0.52, 0.5, 0.58 이다. 펄스 전기장 처리한 myrosinase와 sinigrin의 반응으로 생성된 glucose를 Go kit를 이용하여 발색반응을 통해 흡광도 측정을 하였음.
- 펄스전기장 처리한 myrosinase의 활성도가 정상상태의 처리하지 않은 myrosinase에 비

교하였을 때 차이가 거의 없다는 것을 확인하였음. 이는 펄스전기장 처리가 myrosinase의 구조적 변화를 주지 않는다는 것을 의미함(Fig. 27).

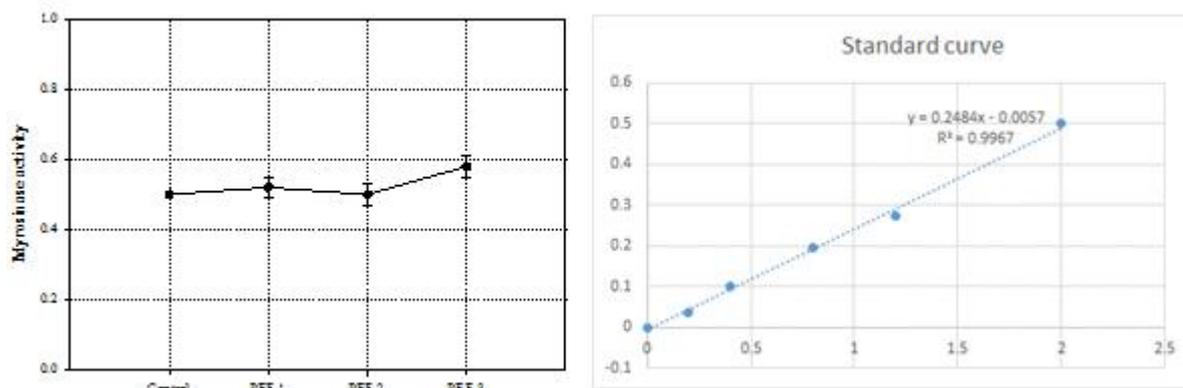


Fig 133. 펄스전기장 처리에 따른 myrosinase 활성 측정

나. Ultra sound 처리에 따른 myrosinase 활성 측정

○ 100배 희석한 myrosinase 원액을 EP tube에 넣고 울트라 사운드 3가지 조건 (30초, 3분, 5분)으로 처리하였음. 처리하지 않은 정상상태의 myrosinase의 활성은 0.54 이고 30초, 3분, 5분 Ultra sound 처리한 myrosinase의 활성은 각각 0.63, 0.56, 0.58 임(Fig. 28).

○ Glucose 생성으로 인한 발색반응의 흡광도 측정을 통해 펄스전기장 처리한 myrosinase의 활성도가 처리하지 않은 myrosinase에 비교하였을 때 약간의 오차는 존재 하지만 활성의 차이가 거의 없다는 것을 확인하였음. 이는 Ultrasound 처리가 myrosinase의 구조적 변화를 주지 않는다는 것을 의미함.

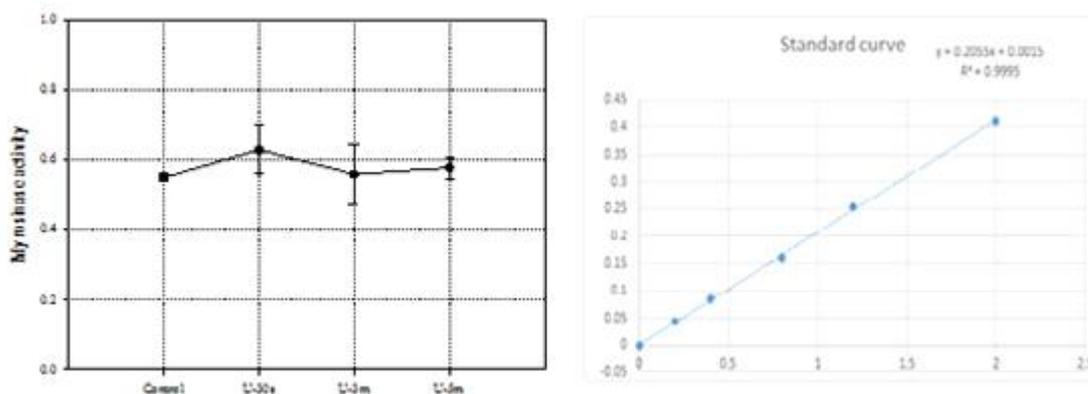


Fig 134. Ultra sound 처리에 따른 myrosinase 활성 측정

다. 초고압처리에 따른 myrosinase 활성 측정

- 100배 희석한 myrosinase 원액을 WHIRL-PAK에 넣고 350 MPa, 450 MPa의 2가지 조건 (5분)으로 초고압 처리하였음.
- 처리하지 않은 정상상태의 myrosinase의 활성은 0.73 이고 초고압 처리 350 MPa, 450 MPa 처리한 활성은 각각 0.63, 0.63 임(Fig. 29).

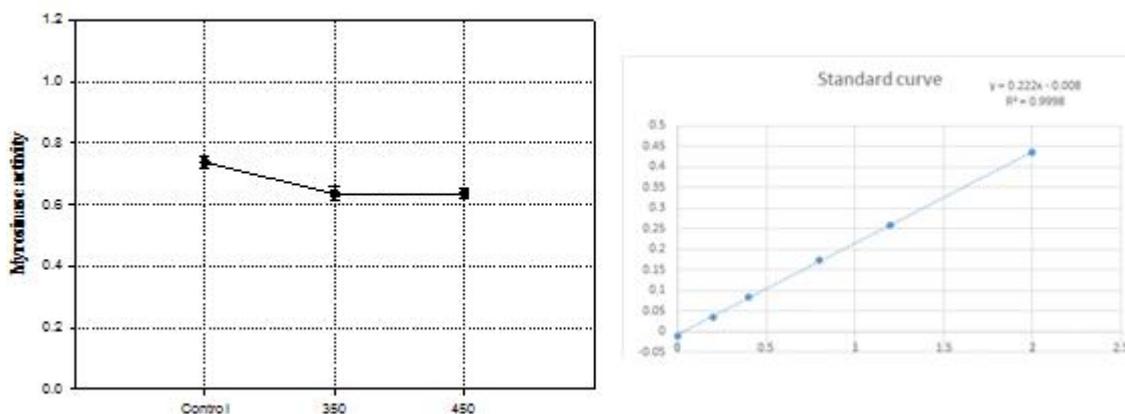


Fig 135. 초고압 처리에 따른 myrosinase 활성 측정

6. PEF 처리 브로콜리 함유 대사체 추출

- PEF 가공 처리에 따른 대사체의 변이를 분석하고자 3가지 조건을 적용하였음. 2 kV/cm, 50 Hz로 condition 1(10초/500 pulse), condition 2(20초/1000 pulse), condition 3(30초/1500 pulse)으로 처리 시간을 달리하여 브로콜리를 꽃 부위와 줄기 부위로 나누어 가공 처리하였음. 동결 건조된 시료 2 g을 70% 메탄올에 넣고 30분 동안 sonication을 실시한 후, 70°C shaking water bath에서 20분동안 추출하였음. 이후 원심분리(12,000 rpm, 15분) 후 상등액을 분리, filtering 및 용매 제거 후 분석에 이용하였음.

7. 대사체 추출물의 흡수 스펙트럼 특성

- 흡수 스펙트럼 특성을 비교한 결과, 280과 320nm에서 특이적인 흡광특성을 나타내는 것으로 나타났음. 280nm에서는 약 1.0, 320nm에서는 약 1.2 수준의 흡광도를 보였고, 시료들간의 유의적인 변이는 관찰되지 않았음(Fig. 30).
- 기존의 선행연구들에 의하면 브로콜리에 함유된 특이적인 대사체인 glucosinolate 계열의

화합물들이 200~300nm대의 흡수 파장을 가진다고 알려져 있어, 이들 흡광특성이 glucosinolate 계열의 대사체들에 기인한 것으로 예상되었음.

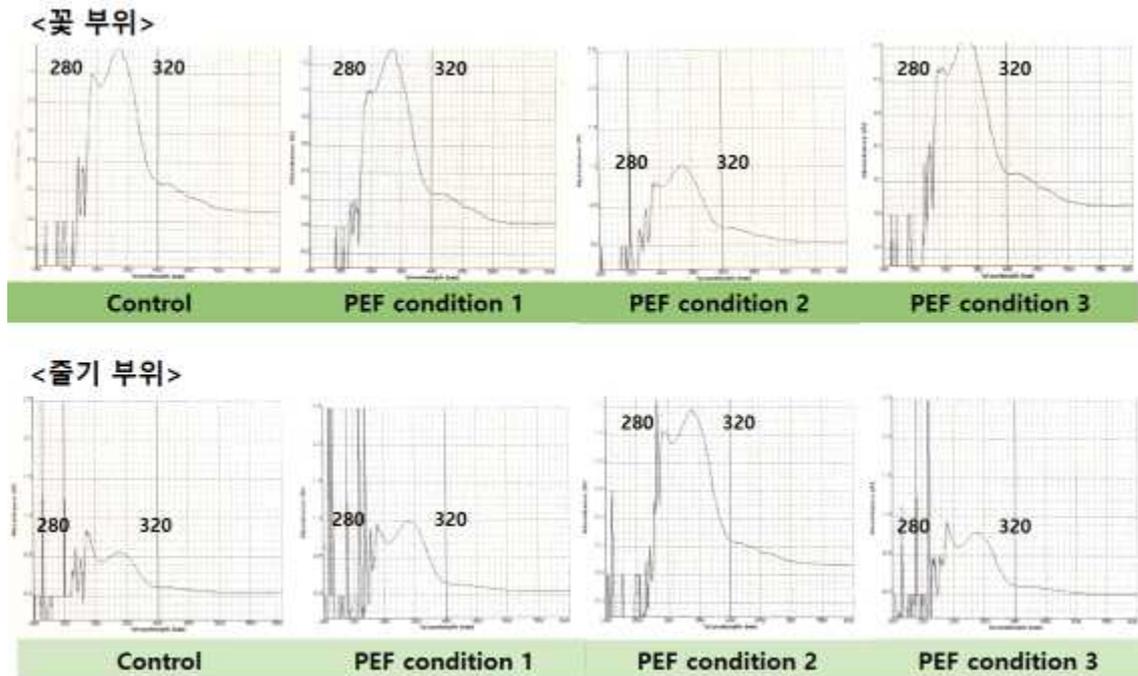


Fig 136. 브로콜리 꽃, 줄기 부위 추출물의 흡수 스펙트럼

8. HPLC 및 LC-MS/MS 기반 브로콜리 함유 대사체 변이 분석

- 브로콜리 함유 대사체의 변이를 분석하기 위해, 우선 HPLC를 이용하여 전체 대사체들의 변화를 비교, 관찰하였음. 아래 그림과 같은 분석 조건을 사용하였고, 물질의 검출은 앞에서 확인된 특이 흡광도인 280과 320nm의 조건을 적용하였음(Fig. 31).
- 브로콜리 시료는 꽃부위와 줄기부위로 나누어 분석하였음.
- 이후 전체 대사체들의 변이를 명확히 분석하기 위하여, LC-MS/MS 분석을 아래의 조건에 수행하였음.
- 모든 분석은 이후의 통계처리를 위해 최소 3반복 이상 수행하고, 결과들을 비교, 분석하였음.

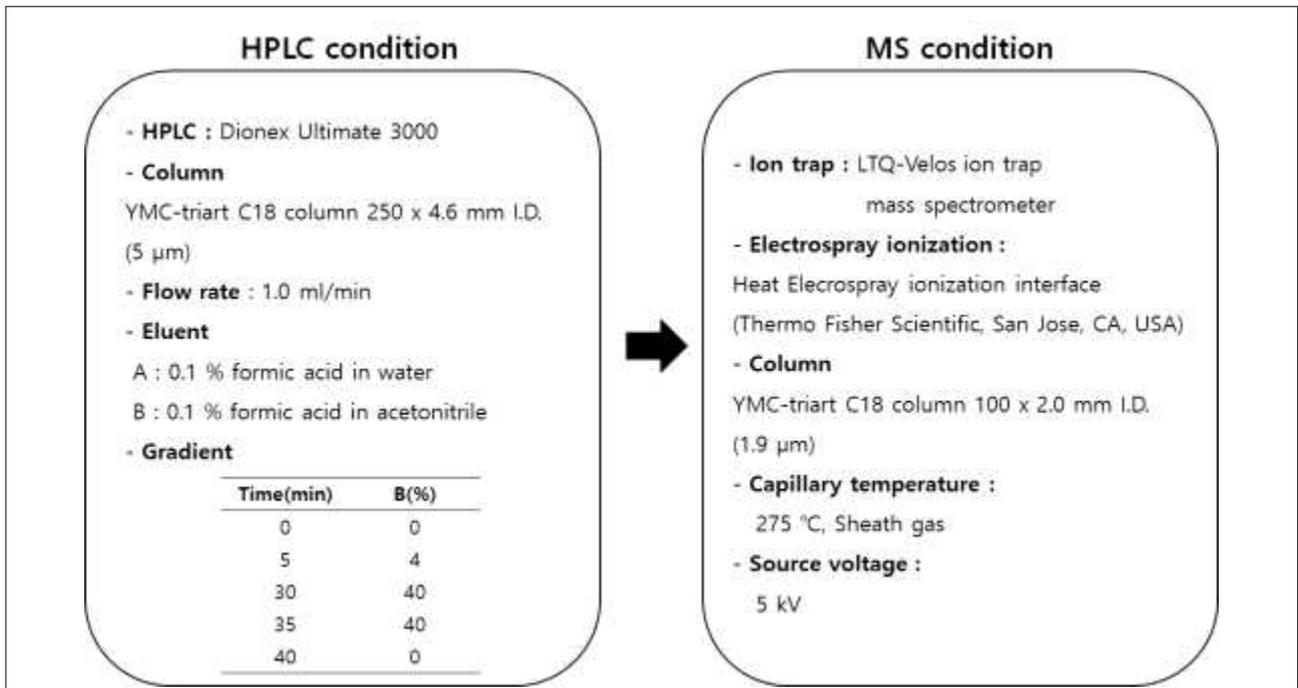


Fig 137. HPLC, LC-MS/MS 분석 조건

- HPLC 분석 결과에서는, 아래 그림에 나타난 바와 같이 280nm에서는 4, 6, 13분대에서 PEF 처리에 의해 intensity에 유의적인 변화가 관찰되었고, 320nm에서는 4, 13분에대에서 유의적인 변화가 나타남이 확인되었음. 이러한 변화는 정도의 차이는 있었으나 꽃과 줄기부위 모두에서 동일하게 관찰되어, PEF 처리에 의한 활성 대사체들의 변이와 관련이 있을 것으로 예측되었음(Fig. 32, Fig. 33).
- 대사체들의 LC-MS/MS 분석은 positive와 negative ion mode 모두에서 수행하였음. 아래 그림에서 보는 바와 같이, TIC profile에서 일부 변이가 관찰되기는 하였으나, 정확한 변이 profile의 확인을 위해서는 이후의 대사체 변이 분석 과정에서 분석될 수 있었음 (Fig. 34, Fig. 35).

<꽃 부위>

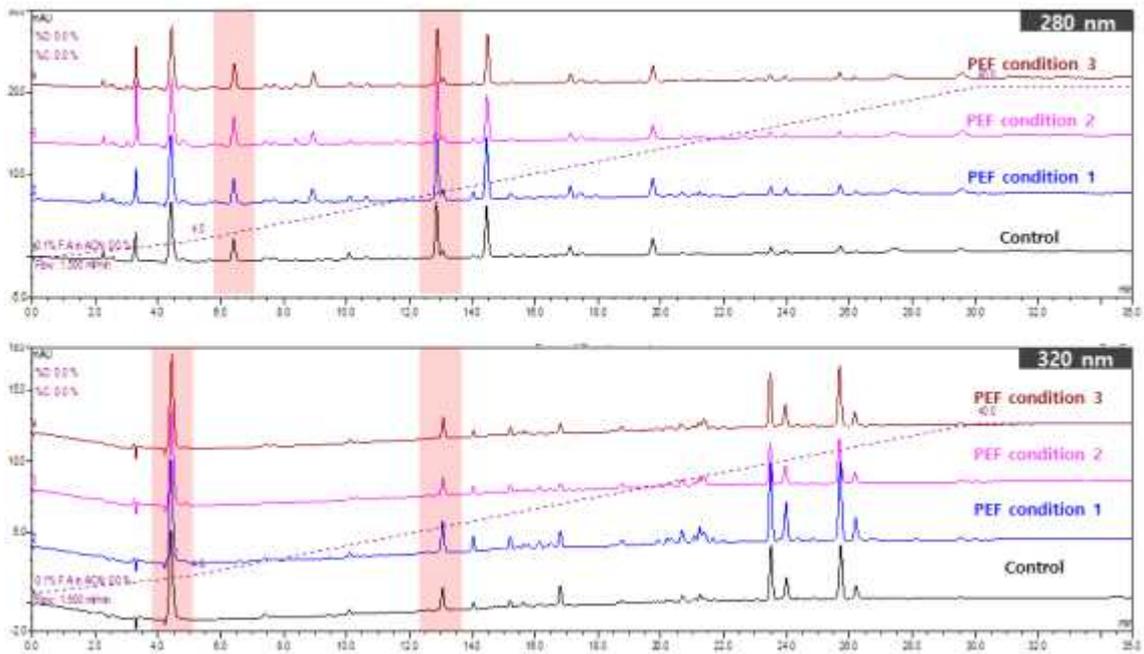


Fig 138. PEF 처리에 따른 브로콜리 꽃부위 추출물의 HPLC 크로마토그램

<줄기 부위>

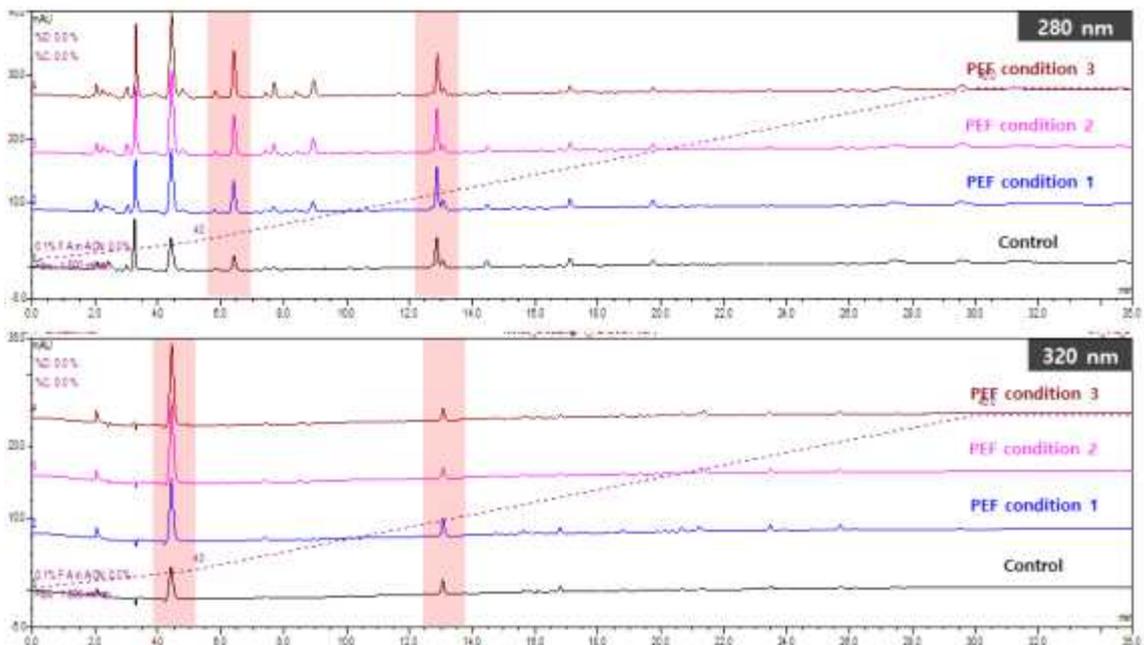
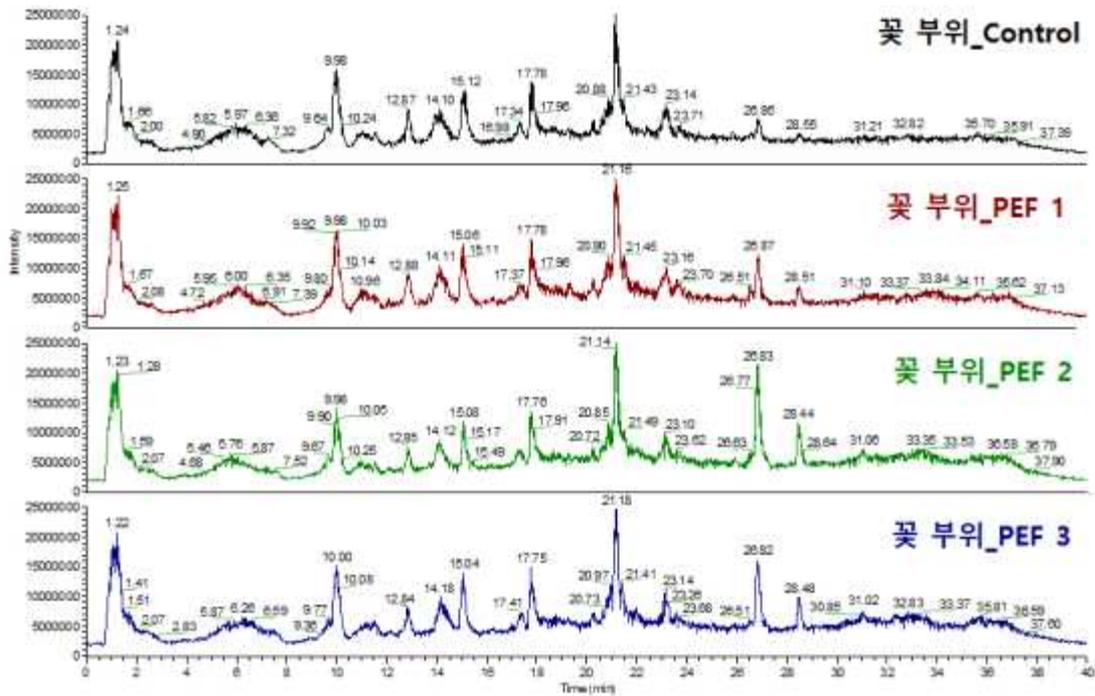


Fig 139. PEF 처리에 따른 브로콜리 줄기부위 추출물의 HPLC 크로마토그램

<Negative ion mode>



<Positive ion mode>

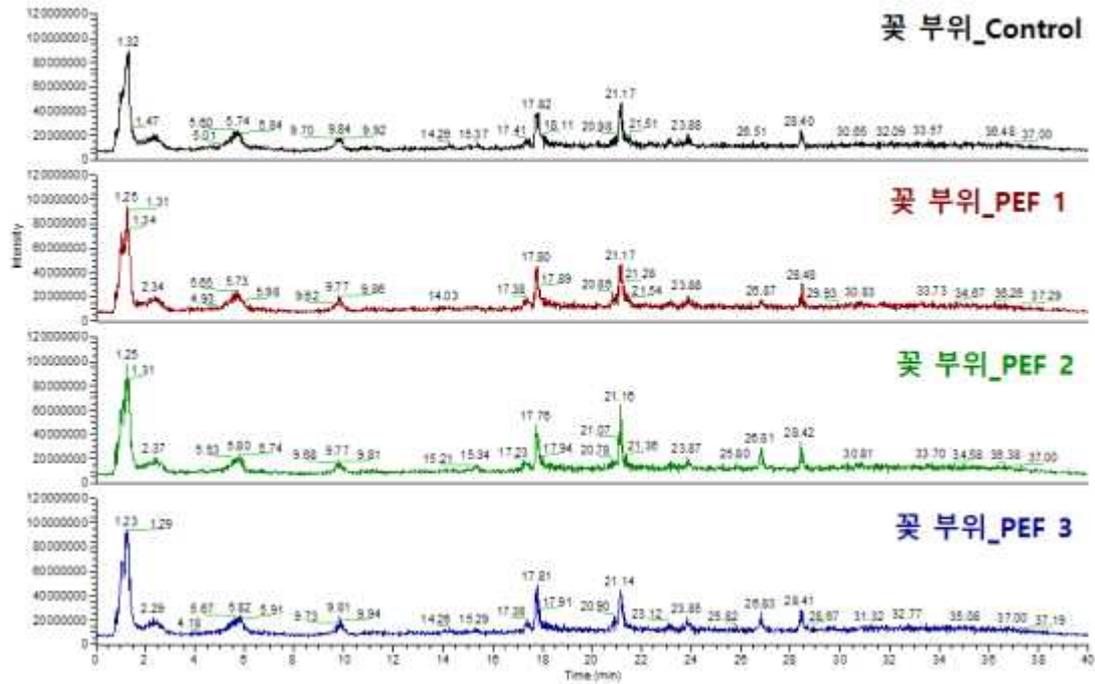
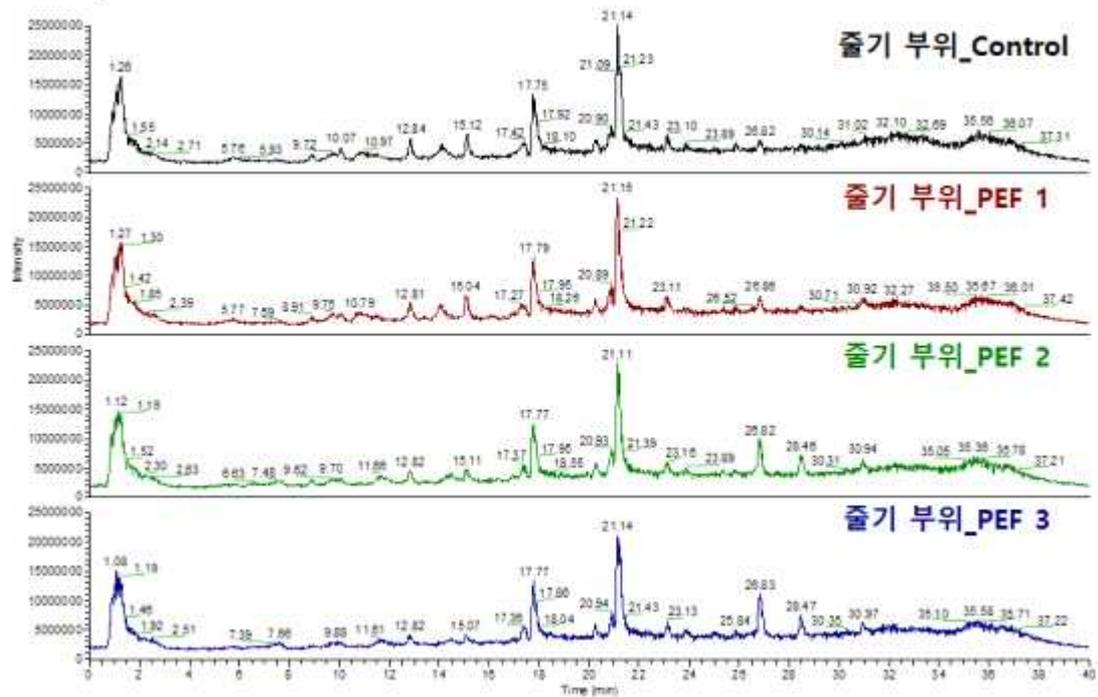


Fig 140. PEF 처리에 의한 브로콜리 꽃부위 추출물의 LC/MS TIC 크로마토그램

<Negative ion mode>



<Positive ion mode>

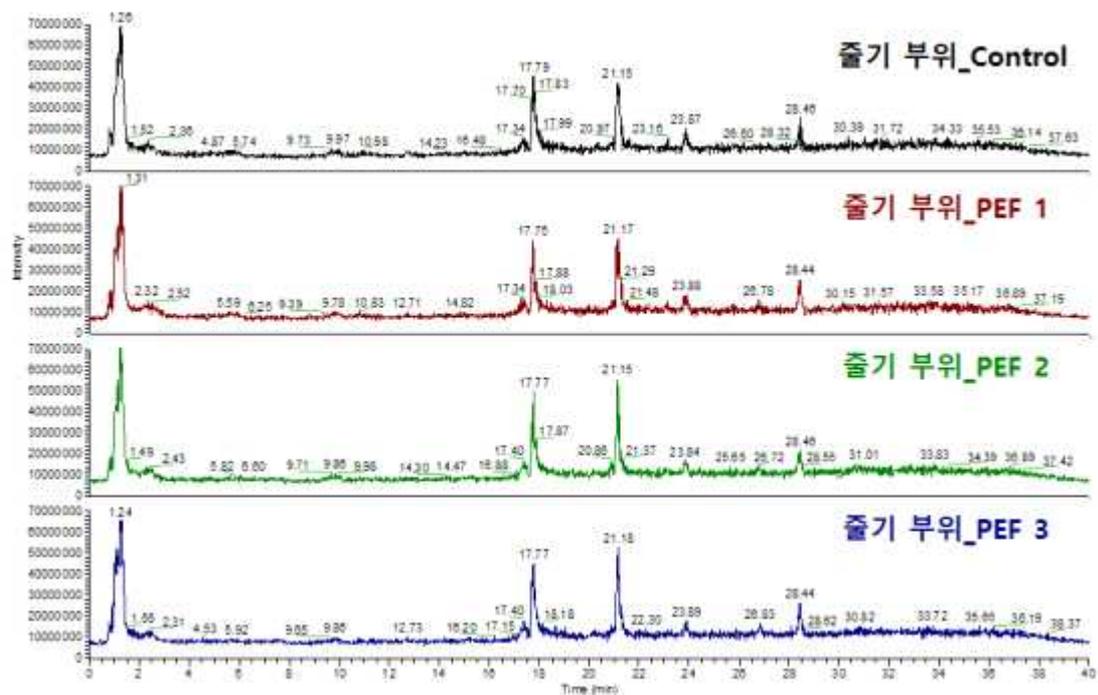


Fig 141. PEF 처리에 의한 브로콜리 줄기부위 추출물의 LC/MS TIC 크로마토그램

9. 브로콜리 함유 대사체 동정을 위한 다변량 통계분석

- LC-MS/MS 분석에 나타난 브로콜리 함유 대사체들의 변이를 규명하기 위해, 전체 대사체 분석 결과를 바탕으로 다변량 통계분석을 실시하였음.
- 3반복 측정된 MS 결과 data들의 alignment를 위해, SIEVE software(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하였음. 이때, m/z width는 2000 ppm, frame time width는 2.5 min, peak intensity threshold는 negative ion mode 경우 꽃, 줄기 부위 모두 20000, positive ion mode 경우 꽃 부위는 150000, 줄기 부위는 200000로 parameter를 지정하여 processing을 수행하였음.
- Peak alignment 수행 결과, 꽃부위의 경우 negative ion mode에서 총 532개, positive ion mode에서는 총 437개의 peak가 검출되었고, 줄기부위는 negative ion mode에서 총 472개, positive에서는 총 262개의 peak가 검출되어, 이들 ion들을 대상으로 이후 통계처리 및 분석을 진행하였음.
- 대사체들의 변이 규명을 위한 다변량통계분석을 SIMCA version 14.0(Umetrics, Sweden)를 이용하여 진행하였음. PCA(Principal component analysis)와 OPLS-DA(Orthogonal partial least squared discriminant analysis) 분석을 실시하였고, 먼저 PCA 분석을 수행하여 PEF 가공 조건별 유사성과 차이성을 확인하여 경향을 분석하였으며, OPLS-DA를 통해 차이를 최대화하여 유의성을 갖는 성분을 동정 및 screening을 진행하였음.
- PEF 처리에 따른 브로콜리의 대사체들의 변이 분석을 위한 loading plot과 이들에 대한 PCA 분석 결과는 아래 그림들과 같았음.
- 꽃부위 함유 대사체들에 대한 분석 결과, 각 처리군별로 유의하게 상이한 대사체들을 함유하고 있음을 확인할 수 있었음. 대조군(Control)과 비교하여, 처리군들은 PC1을 기준으로 명확히 구분되는 것을 확인할 수 있었음.
- 줄기부위 함유 대사체들의 분석 결과에서도, PEF 처리에 의한 변이를 확인할 수 있었음. 대조군과 처리군들은 역시 PC1을 기준으로 구분되는 것으로 나타나, 대사체에 유의적인 변이가 있음을 나타내었음.

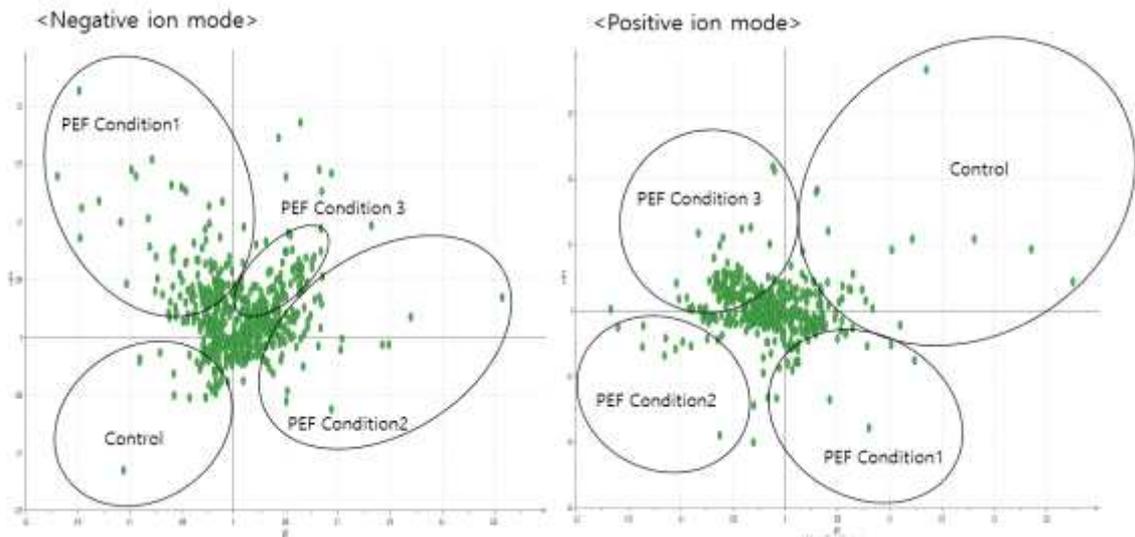


Fig 142. 브로콜리 꽃부위 대사체의 변이 분석을 위한 loading plot

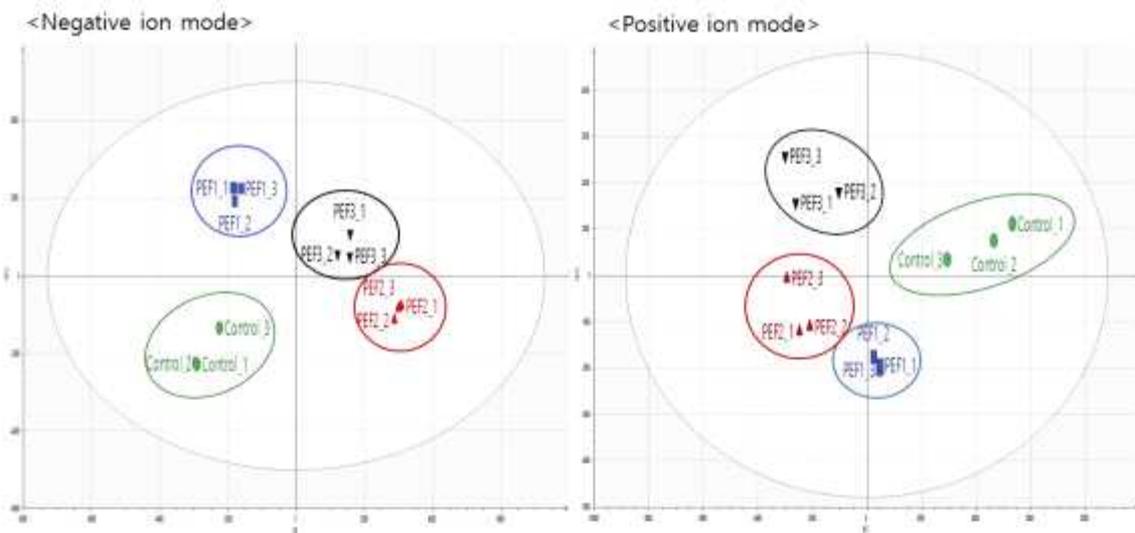


Fig 143. 브로콜리 꽃부위 함유 대사체의 변이 규명을 위한 PCA(Principal Component Analysis) 분석

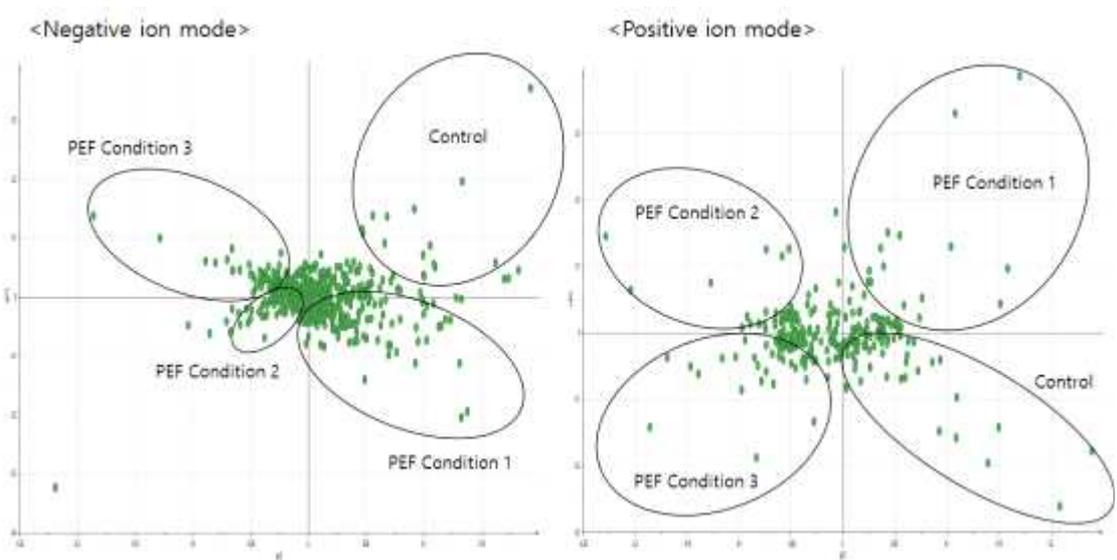


Fig 144. 브로콜리 줄기부위 대사체의 변이 분석을 위한 loading plot

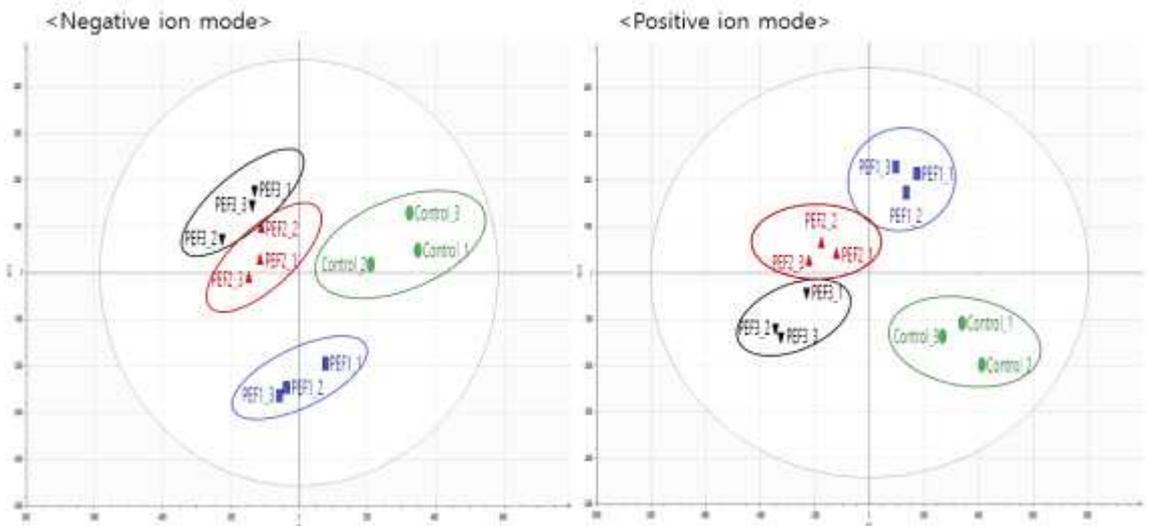


Fig 145. 브로콜리 줄기부위 함유 대사체의 변이 분석을 위한 PCA(Principal Component Analysis) 분석.

○ 앞의 PCA 분석에 나타난 바와 같이, PEF 처리에 의해 각 처리군별로 상이한 대사체가 존재함을 확인하였음. 이러한 대사체의 변이를 규명하기 위해, 이를 일으키는 주요 대사체들의 존재를 VIP(Variable importance in the projection) value를 기준으로 선별하였음. VIP value는 OPLS-DA model에서 각각의 시료들간의 차이에 대한 상대적인 기여도를 나타내는 값으로, VIP value가 높을수록 주요 대사체로 판단되며, 통상적으로 VIP value가 1이상인 값을 신뢰함.

○ 아래 그림은 브로콜리의 꽃과 줄기 함유 대사체들 중 PEF처리에 의한 변이에 기여한

VIP value가 1이상인 주요 대사체들을 나타낸 것임. 꽃부위의 경우, negative ion mode에서는 총 136개, positive ion mode에서는 총 117개가 선발되었고, 줄기부위에서는 negative ion mode에서는 총 106개, positive ion mode에서는 총 63개의 대사체들이 선발되었음. Raw data와 비교할 때, PEF 처리에 의해 약 25% 가량의 대사체에 유의적인 변이가 발생한 것을 확인할 수 있었음.

○ PEF 처리에 의한 대사체들의 변이는 아래의 heat map에 나타난 바와 같이 증가, 감소의 경향이 다양하게 나타나는 것을 확인할 수 있었음.

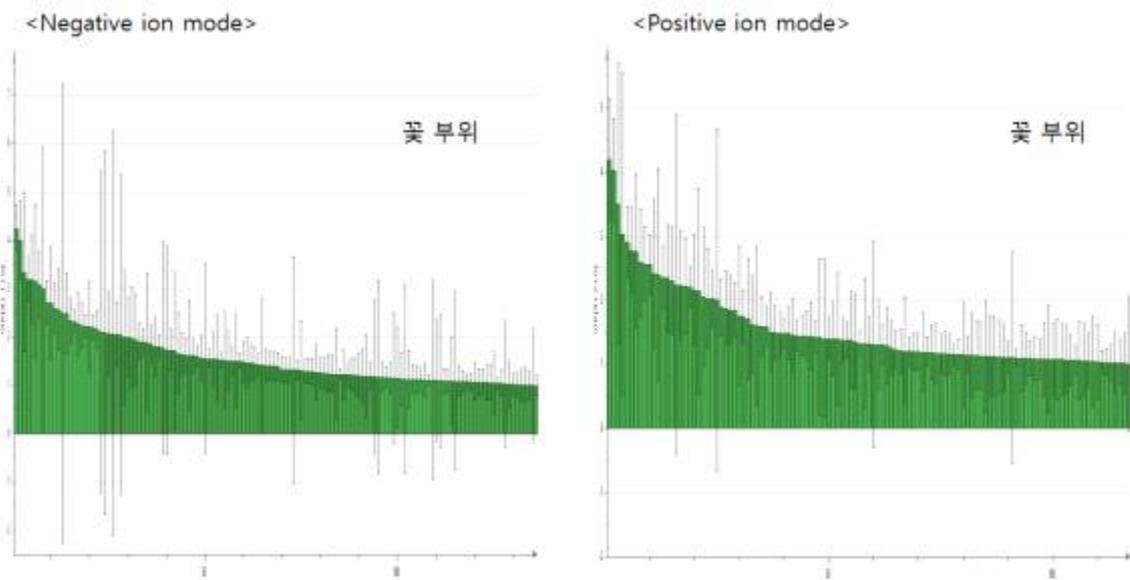


Fig 146. 브로콜리 꽃부위 함유 대사체들의 VIP value(VIP>1)

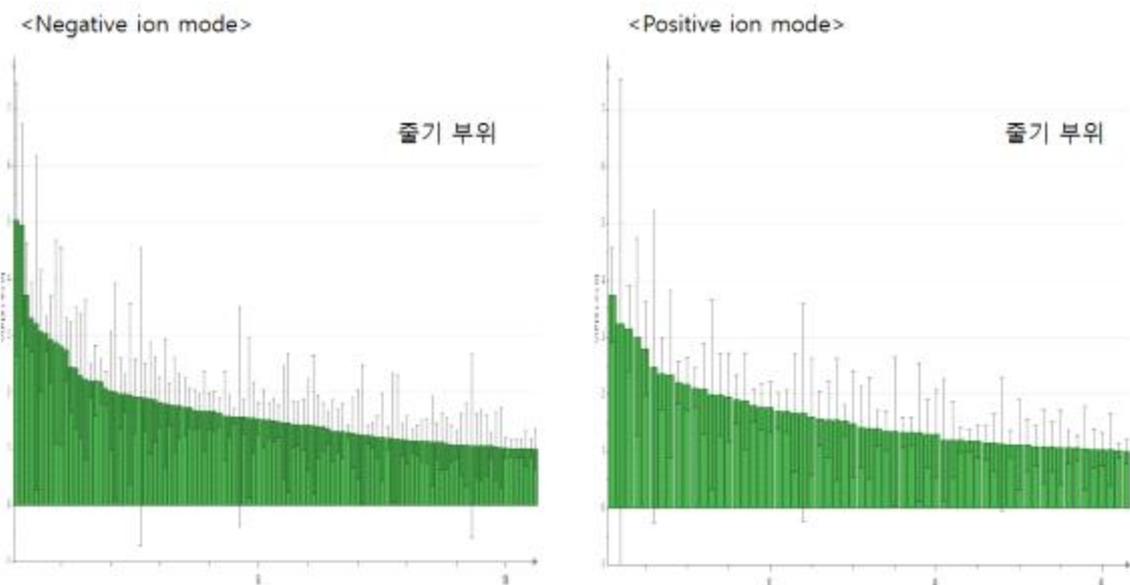


Fig 147. 브로콜리 줄기부위 함유 대사체들의 VIP value(VIP>1)

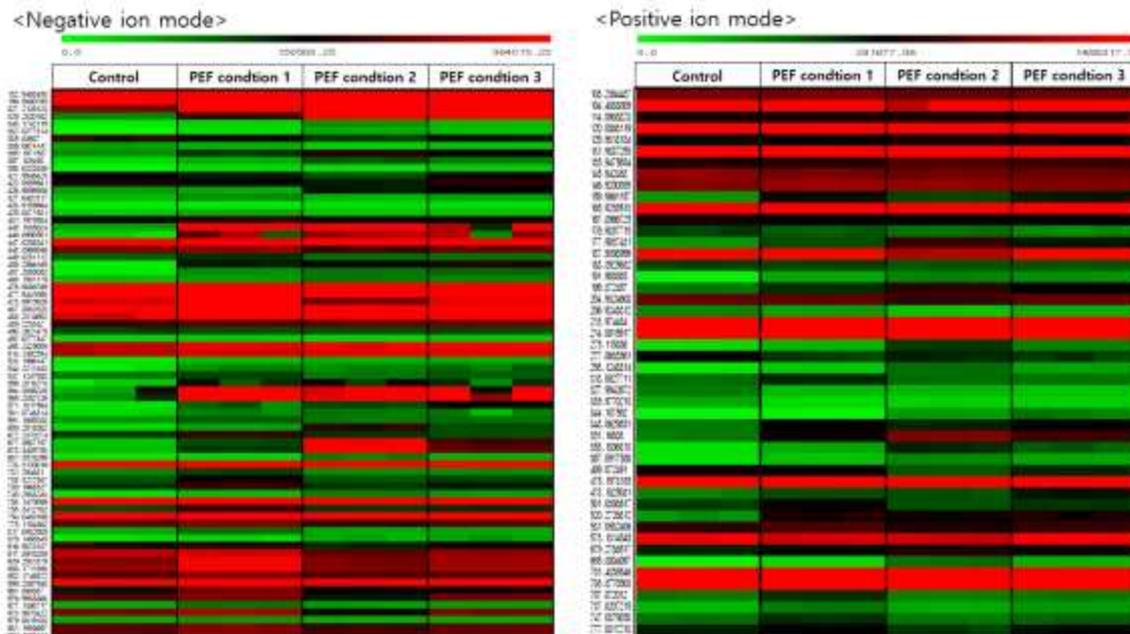


Fig 148. 브로콜리 꽃부위 대사체의 변이를 정리한 Heat map

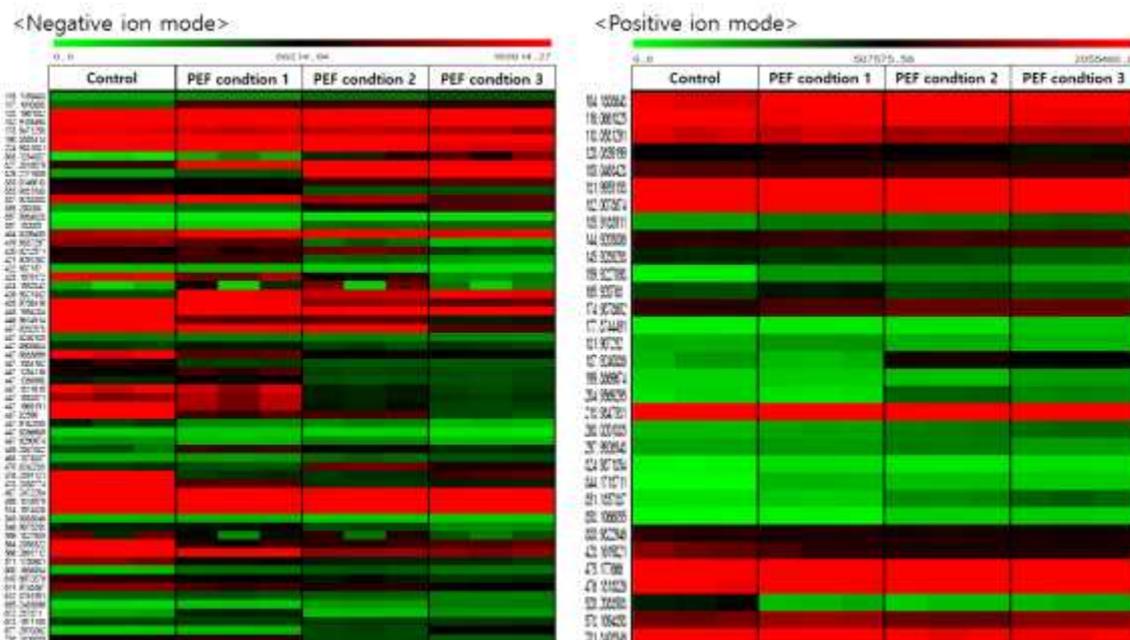


Fig 149. 브로콜리 줄기부위 대사체의 변이를 정리한 Heat map

가. PEF 처리에 의한 브로콜리 꽃부위의 변이 대사체 동정

○ PEF 처리에 의한 대조군 대비 변이를 나타낸 대사체를 OPLS-DA 분석을 통해 5% 유의수준 선별하고, 이들 중 VIP 값이 1이상인 후보물질들을 선별하고 동정을 실시하였음.

- 아래의 표에 나타난 바와 같이, PEF condition 1에서 유의적인 차이가 나는 주요 성분들은 3-Indolylmethyl(glucobrassicin), 4-methoxyglucobrassicin과 같은 Glucosinolate계열과 Dodecanedioic acid 유도체, Trisinapoyl-dihexoside로 확인되었음(Table 4).
- PEF 처리군 2(condition 2)에서는 negative ion mode에서 Dodecanedioic acid 유도체가 주요 대사체로 분석되었으며, positive ion mode에서는 1-Acetylindole이 주요 변이 대사체로 확인되었음.
- PEF 처리군 3(condition 3)에서는 negative ion mode에서 Dodecanedioic acid 유도체와 Trisinapoyl-dihexoside가, positive ion mode에서는 1-Acetylindole이 주요 변이 대사체로 확인되었음.

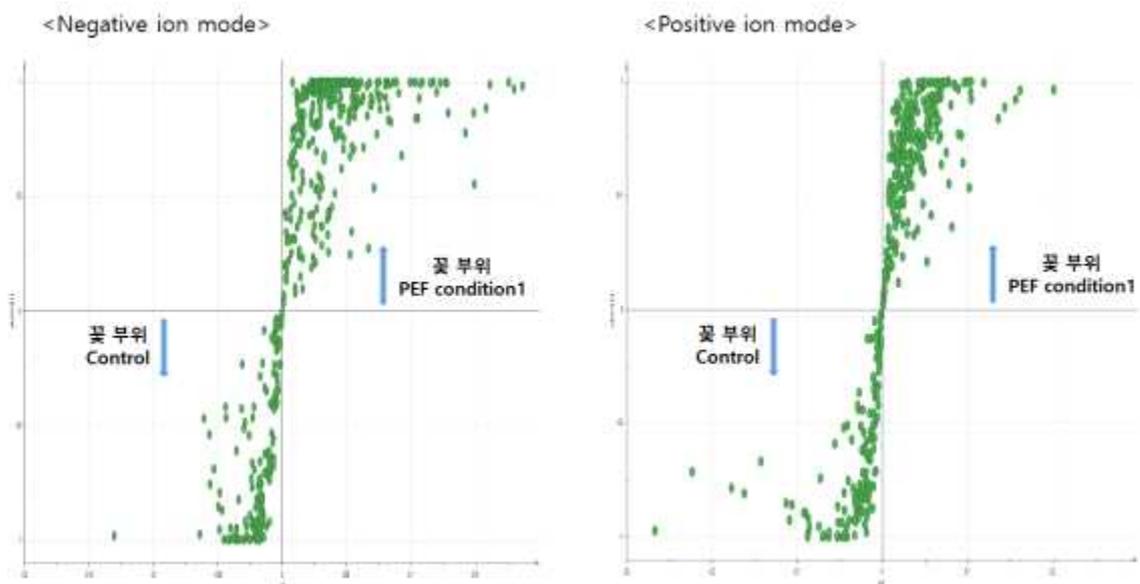


Fig 150. 브로콜리 꽃부위 함유 대사체의 OPLS-DA 분석(Control vs. PEF condition1)

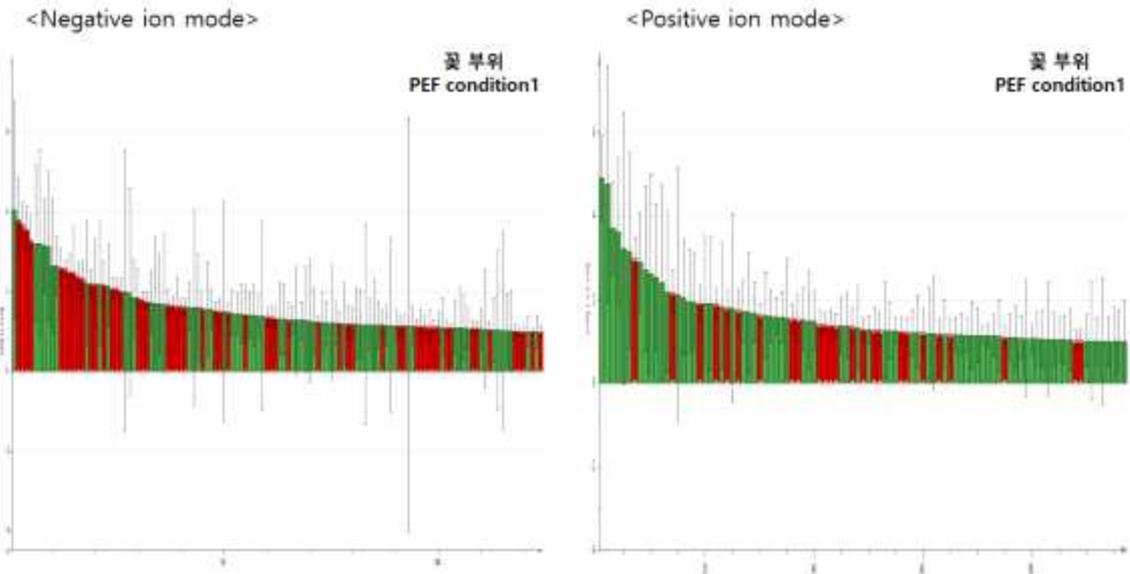


Fig 151. 브로콜리 꽃부위 함유 대사체의 VIP value(VIP>1, Control vs. PEF condition1)

Table 67. PEF condition1 처리에 의한 브로콜리 꽃부위 주요 변이 대사체 동정

| <Negative ion mode> | | | | | | |
|---------------------|-------|---------|--------|------------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| m/z | RT | nm | ms/ms | | Tentative identification | Reference |
| 327.23 | 26.89 | 223 309 | 229.14 | 291.21 211.12 309.24 171.10 | Dodecanedioic acid derivative | metlin |
| 329.20 | 28.51 | 233 308 | 229.13 | 211.12 311.21 293.20 271.87 | Dodecanedioic acid derivative | metlin |
| 447.02 | 9.91 | 247 308 | 258.97 | 290.94 274.95 204.97 268.97 367.04 | 3-Indolylmethyl (glucobrassicin) | S.J. Rochfort et al. |
| 477.06 | 10.96 | 223 327 | 259.00 | 290.97 274.97 299.09 235.02 281.02 | 4-methoxyglucobrassicin | S.J. Rochfort et al. |
| 959.23 | 23.16 | 238 352 | 735.16 | 736.06 529.15 511.09 | Trisinapoyl-dihexoside | C.Engels et al. |

| <Positive ion mode> | | | | | | |
|---------------------|---------|---------|-----------------------|----------------------|--------------------------|-----------|
| m/z | RT | nm | ms/ms | | Tentative identification | Reference |
| 159.966 | 12.4457 | 230 304 | 131.99(116.73 104.10) | 130.02 133.02 142.96 | 1-Acetylindole | metlin |

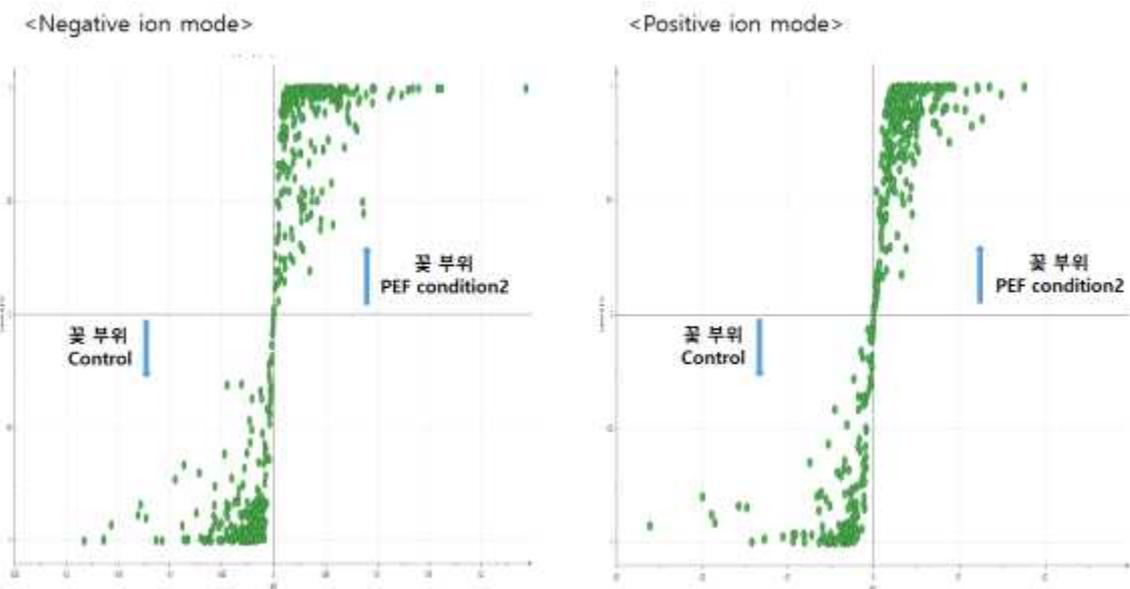


Fig 152. 브로콜리 꽃부위 함유 대사체의 OPLS-DA 분석(Control vs. PEF condition2)

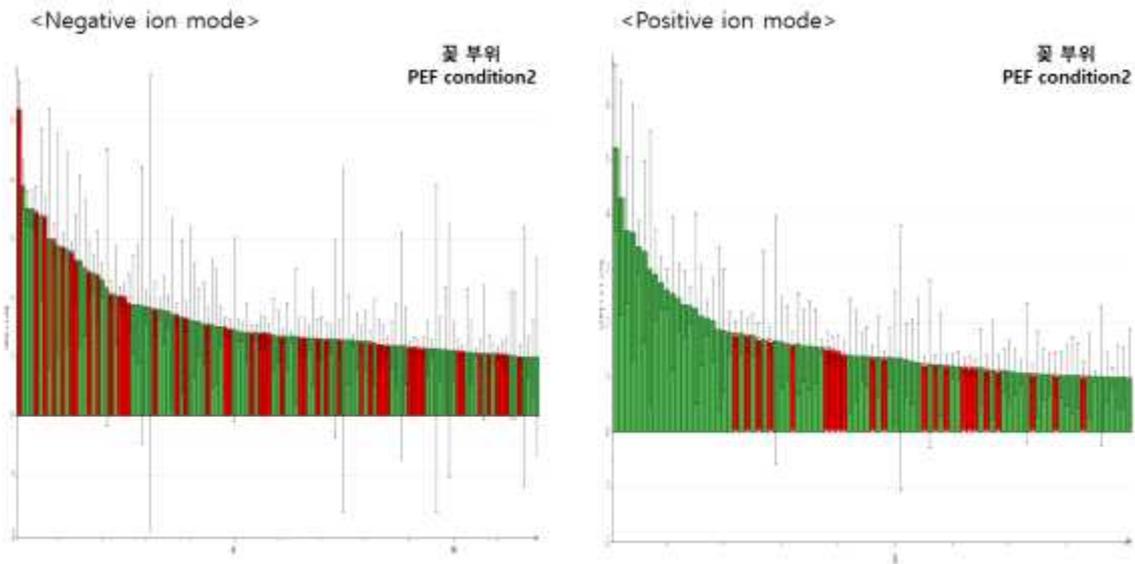


Fig 153. 브로콜리 꽃부위 함유 대사체의 VIP value(VIP>1, Control vs. PEF condition2)
 Table 68. PEF condition2 처리에 의한 브로콜리 꽃부위 주요 변이 대사체 동정

<Negative ion mode>

| m/z | RT | nm | ms/ms | Tentative identification | Reference |
|---------|---------|---------|------------------------------------|-------------------------------|-----------|
| 327.181 | 29.2266 | 233 307 | 229.12 171.07 291.17 211.11 309.20 | Dodecanedioic acid derivative | metlin |

<Positive ion mode>

| m/z | RT | nm | ms/ms | Tentative identification | Reference |
|--------|-------|----------|----------------------------------|--------------------------|-----------|
| 159.95 | 12.38 | 245, 300 | 132.01 142.92 57.07 97.02 130.04 | 1-Acetylindole | metlin |

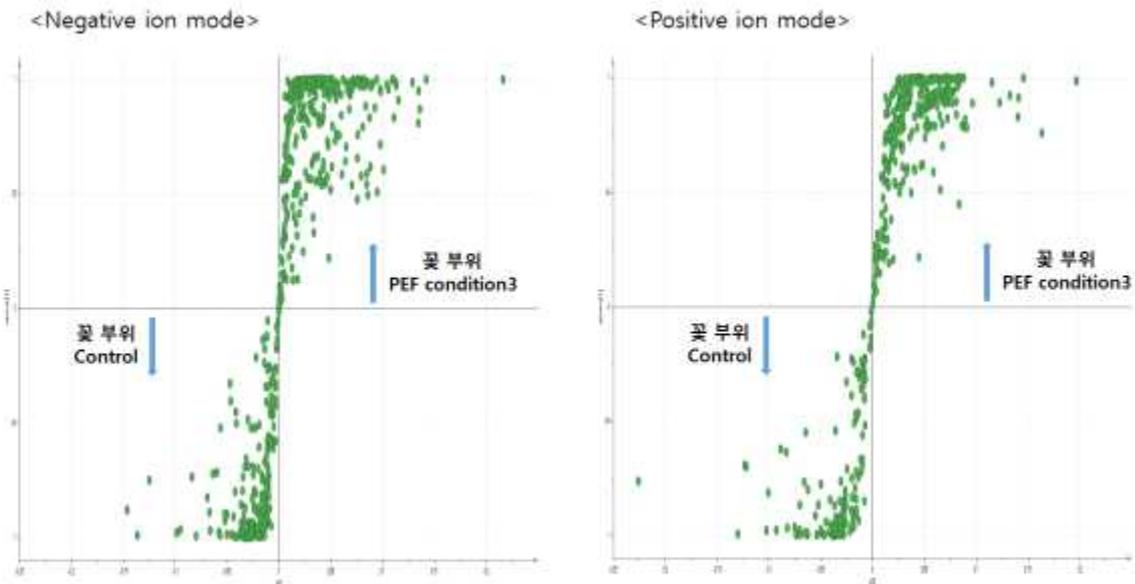


Fig 154. 브로콜리 꽃부위 함유 대사체의 OPLS-DA 분석(Control vs. PEF condition3)

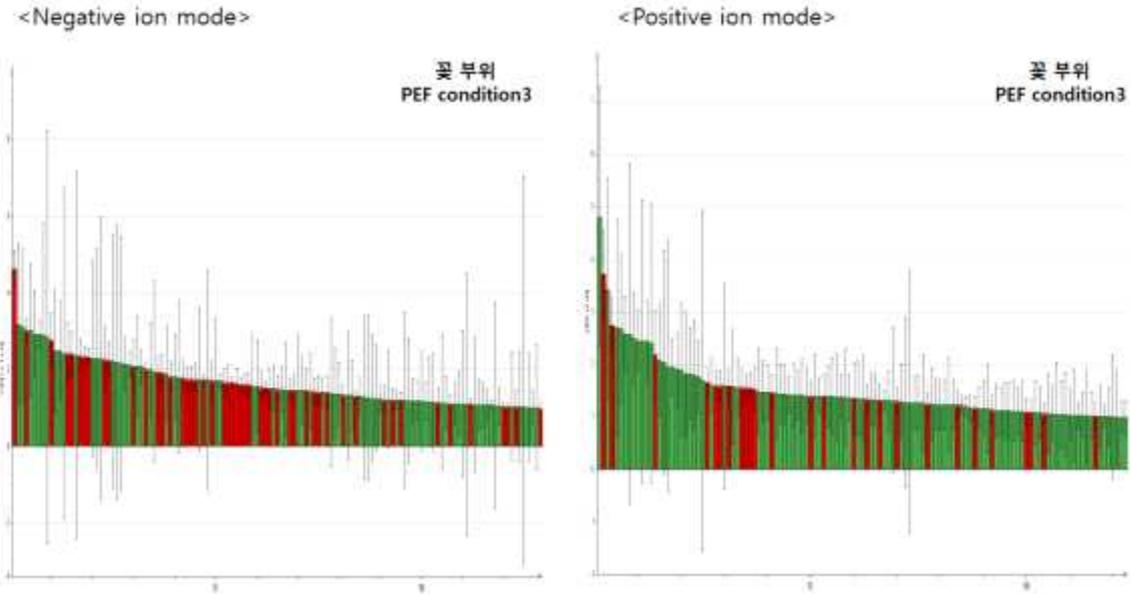


Fig 155. 브로콜리 꽃부위 함유 대사체의 VIP value(VIP>1, Control vs. PEF condition3)

Table 69. PEF condition3 처리에 의한 브로콜리 꽃부위 주요 변이 대사체 동정

| <Negative ion mode> | | | | | | | | | |
|---------------------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------------------------|-----------|---|
| m/z | RT | nm | ms/ms | | | | Tentative identification | Reference | |
| 329.25 | 28.46 | 231 304 | 229.08 | 211.06 | 311.17 | 293.16 | 171.04 | 271.81 | Dodecanedioic acid derivative metlin |
| 959.189 | 26.5867 | 238 352 | 735.16 | 736.06 | 529.15 | 511.09 | | | Trisinapoyl-dihexoside C.Engels et al. |

| <Positive ion mode> | | | | | | | | | |
|---------------------|---------|---------|---------------|---------|--------|--------|--------------------------|-----------|--------------------------|
| m/z | RT | nm | ms/ms | | | | Tentative identification | Reference | |
| 159.966 | 12.4457 | 230 304 | 131.99(116.73 | 104.10) | 130.02 | 133.02 | 142.96 | | 1-Acetylindole metlin |

나. PEF 처리에 의한 브로콜리 줄기부위의 변이 대사체 동정

- PEF 처리에 의한 대조군 대비 변이를 나타낸 대사체를 OPLS-DA 분석을 통해 5% 유의수준 선별하고, 이들 중 VIP 값이 1이상인 후보물질들을 선별하고 동정을 실시하였음.
- 아래의 표에 나타난 바와 같이, PEF condition 1에서 유의적인 차이가 나는 주요 성분들은 negative ion mode에서 Succinate, Quinic acid, Dodecanedioic acid 유도체가, 그리고 positive ion mode에서 Aminohydroxybutyric acid, L-Arginine이 동정되었음.
- PEF 처리군 2(condition 2)에서는 negative ion mode에서 Succinate, Dodecanedioic acid 유도체가, 그리고 positive ion mode에서 1-Acetylindole, L-Arginine, 5'-Deoxy-5'

-(methylthio)adenosine이 확인되었음.

○ PEF 처리군 3(condition 3)에서는 negative ion mode에서 Succinate, Dodecanedioic acid 유도체가, 그리고 positive ion mode에서 1-Acetylindole, L-Arginine 확인되었음.

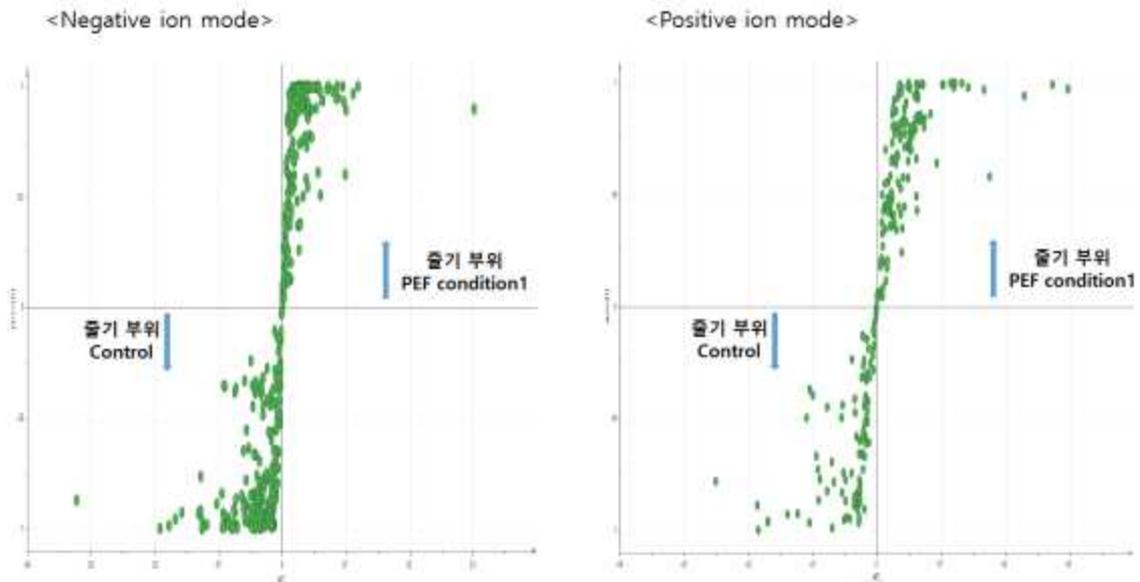


Fig 156. 브로콜리 줄기부위 함유 대사체의 OPLS-DA 분석(Control vs. PEF condition1)

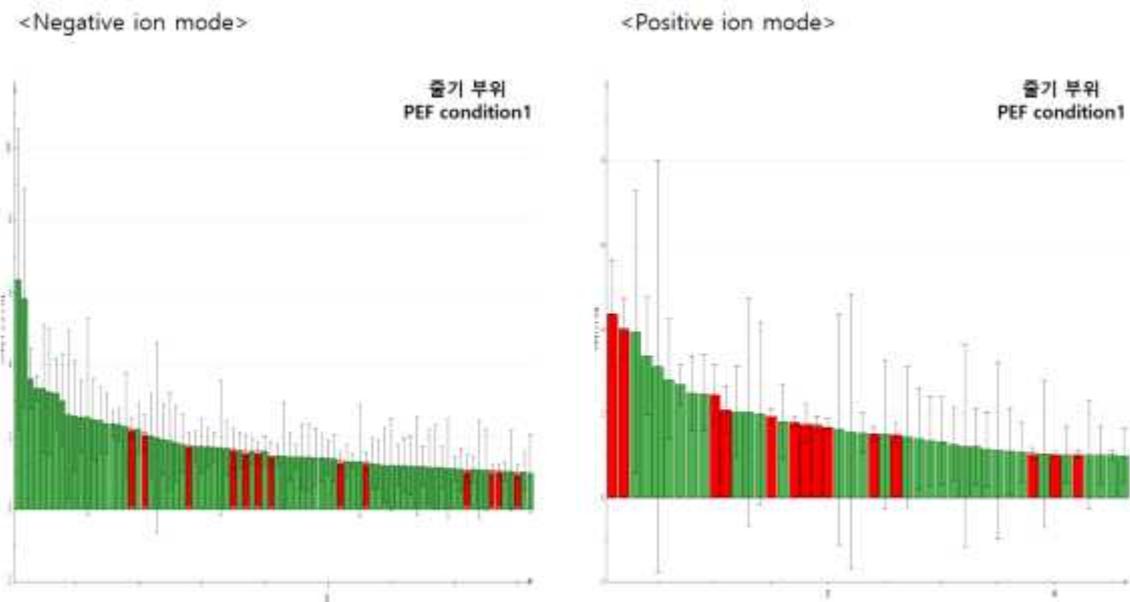


Fig 157. 브로콜리 줄기부위 함유 대사체의 VIP value(VIP>1, Control vs. PEF condition1)

Table 70. PEF condition1 처리에 의한 브로콜리 줄기부위 주요 변이 대사체 동정

| <Negative ion mode> | | | | | | |
|---------------------|-------|---------|---|-------------------------------|-----------------|--|
| m/z | RT | nm | ms/ms | Tentative identification | Reference | |
| 117.20 | 1.29 | 257 301 | 73.04 99.02 72.13 74.03 71.12 59.18 | Succinic acid | metlin | |
| 190.88 | 1.23 | 281 306 | 111.00 172.93 128.95 130.95 87.17 85.24 | Quinic acid | metlin | |
| 327.16 | 26.72 | 227 301 | 229.11 291.15 211.09 171.05 309.16 | Dodecanedioic acid derivative | metlin | |
| 329.18 | 28.30 | 231 300 | 229.10 211.09 311.17 293.17 230.06 212.06 | Dodecanedioic acid derivative | metlin | |
| 959.23 | 23.16 | 238 352 | 735.16 736.06 529.15 511.09 | Trisnaphoyl-dihexoside | C.Engels et al. | |

| <Positive ion mode> | | | | | | |
|---------------------|------|---------|----------------------------|--------------------------|-----------|--|
| m/z | RT | nm | ms/ms | Tentative identification | Reference | |
| 120.03 | 5.84 | 224 311 | 73.13 74.06 72.14 102.08 | Aminohydroxybutyric acid | metlin | |
| 174.97 | 1.02 | 248 306 | 60.00 158.05 116.00 130.01 | L-Arginine | metlin | |

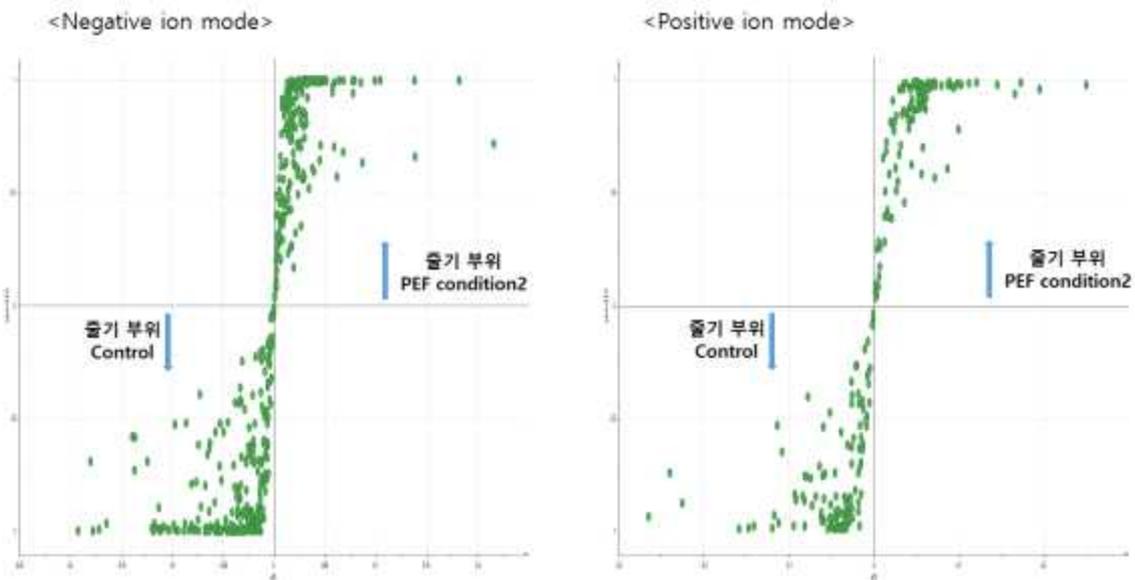


Fig 158. 브로콜리 줄기부위 함유 대사체의 OPLS-DA 분석(Control vs. PEF condition2)

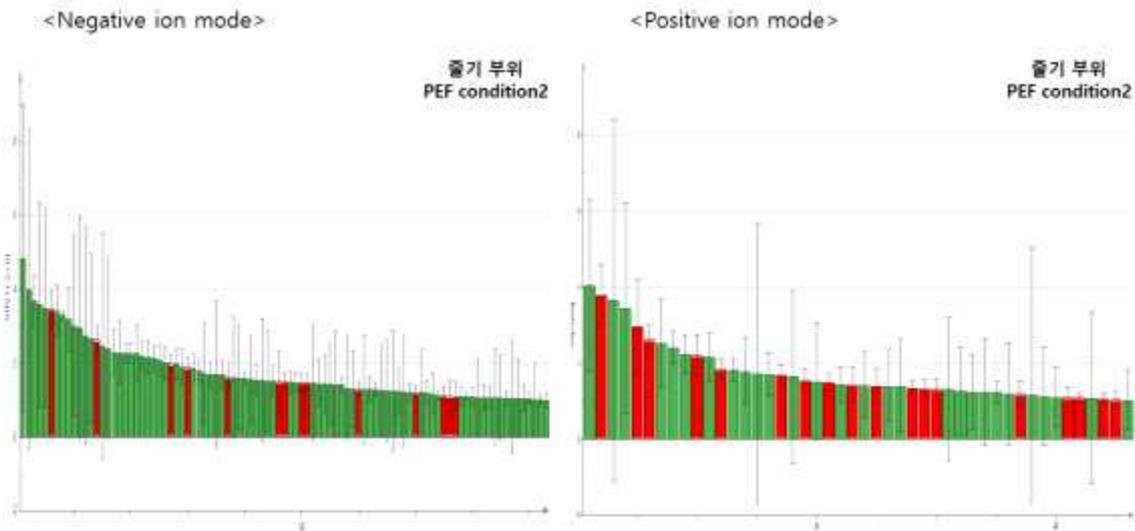


Fig 159. 브로콜리 줄기부위 함유 대사체의 VIP value(VIP>1, Control vs. PEF condition2)

Table 71. PEF condition2 처리에 의한 브로콜리 줄기부위 주요 변이 대사체 동정

| <Negative ion mode> | | | | | | |
|---------------------|-------|---------|------------------------------------|-------------------------------|-----------|--|
| m/z | RT | nm | ms/ms | Tentative identification | Reference | |
| 117.19 | 1.25 | 266 310 | 73.0 98.96 74.04 100.10 72.21 | Succinic acid | metlin | |
| 329.171 | 28.44 | 227 322 | 229.11 211.10 311.21 293.18 171.04 | Dodecanedioic acid derivative | metlin | |

| <Positive ion mode> | | | | | | |
|---------------------|-------|---------|--|-----------------------------------|-----------|--|
| m/z | RT | nm | ms/ms | Tentative identification | Reference | |
| 159.934 | 14.18 | 231 304 | 144.94 145.95 128.02 131.97 141.94 | 1-Acetylindole | metlin | |
| 174.988 | 1.00 | 259 304 | 60.02 158.03 157.04 115.98 130.08 70.13 | L-Arginine | metlin | |
| 297.981 | 10.30 | 216 317 | 136.02 163.01 270.03 144.98 252.04 97.09 | 5'-Deoxy-5'-(methylthio)adenosine | metlin | |

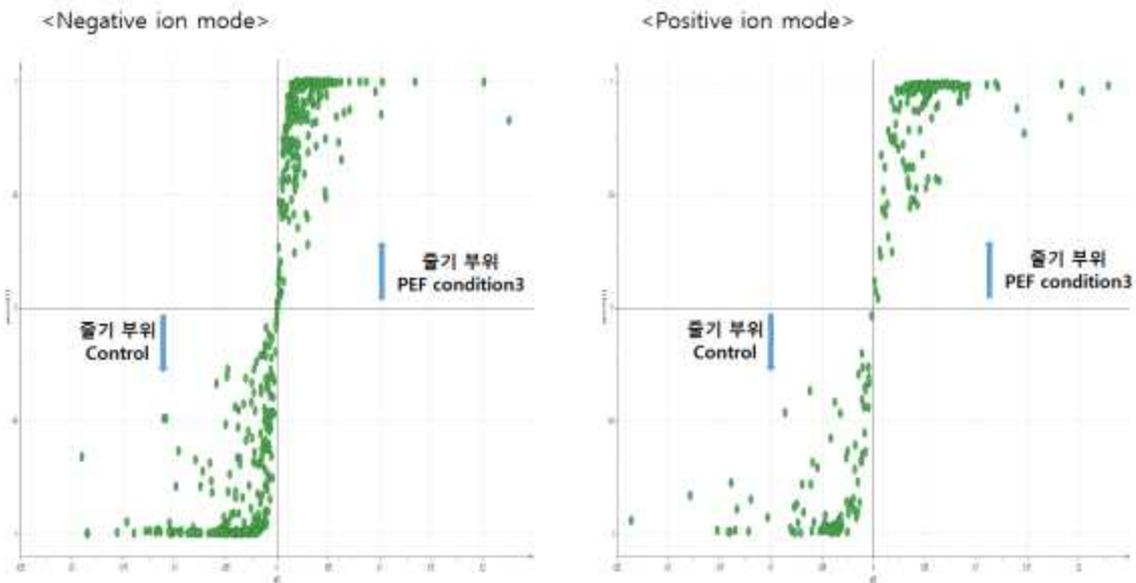


Fig 160. 브로콜리 줄기부위 함유 대사체의 OPLS-DA 분석(Control vs. PEF condition3)

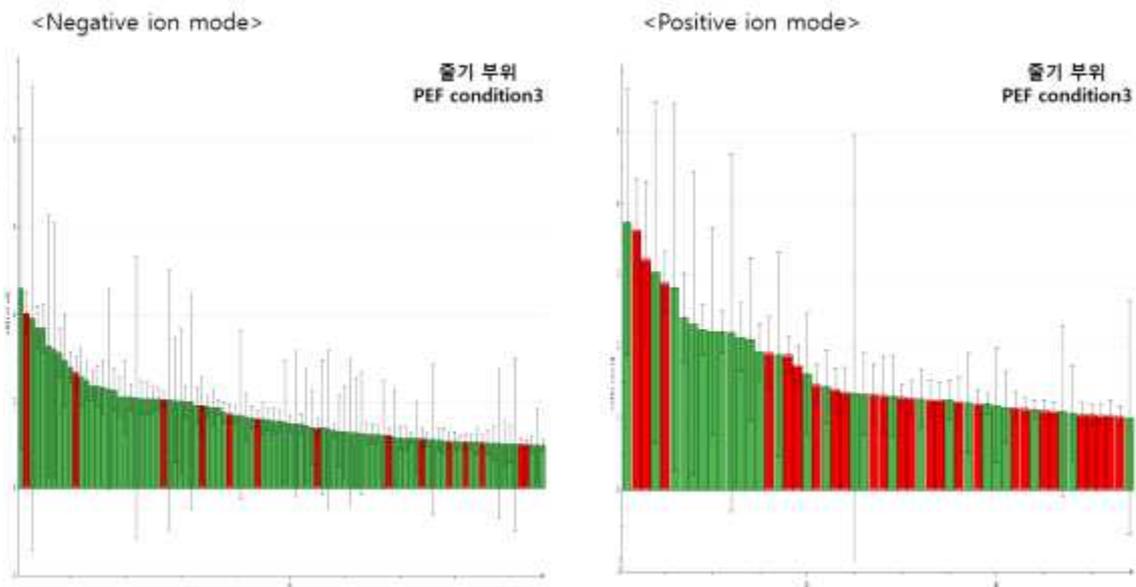


Fig 161. 브로콜리 줄기부위 함유 대사체의 VIP value(VIP>1, Control vs. PEF condition3)

Table 72. PEF condition3 처리에 의한 브로콜리 줄기부위 주요 변이 대사체 동정

| <Negative ion mode> | | | | | | |
|---------------------|-------|---------|------------------------------------|-----------------------------|-----------|--|
| m/z | RT | nm | ms/ms | Tentative identification | Reference | |
| 117.17 | 1.29 | 278 303 | 73.08 98.98 73.94 100.05 72.14 | Succinic acid | metlin | |
| 327.20 | 26.8 | 234 312 | 229.09 291.16 211.07 171.05 309.16 | Dodecanedioic acid derivate | metlin | |
| 329.21 | 28.48 | 233 307 | 229.10 211.08 311.19 293.18 230.09 | Dodecanedioic acid derivate | metlin | |

| <Positive ion mode> | | | | | | |
|---------------------|------|---------|-----------------------------------|--------------------------|-----------|--|
| m/z | RT | nm | ms/ms | Tentative identification | Reference | |
| 174.98 | 1.03 | 260 300 | 60.05 158.04 157.07 116.01 130.01 | L-Arginine | metlin | |

○ 이상의 분석 결과로 확인 및 동정된 변이 대사체들은 아래와 같은 구조의 화합물들이었음.

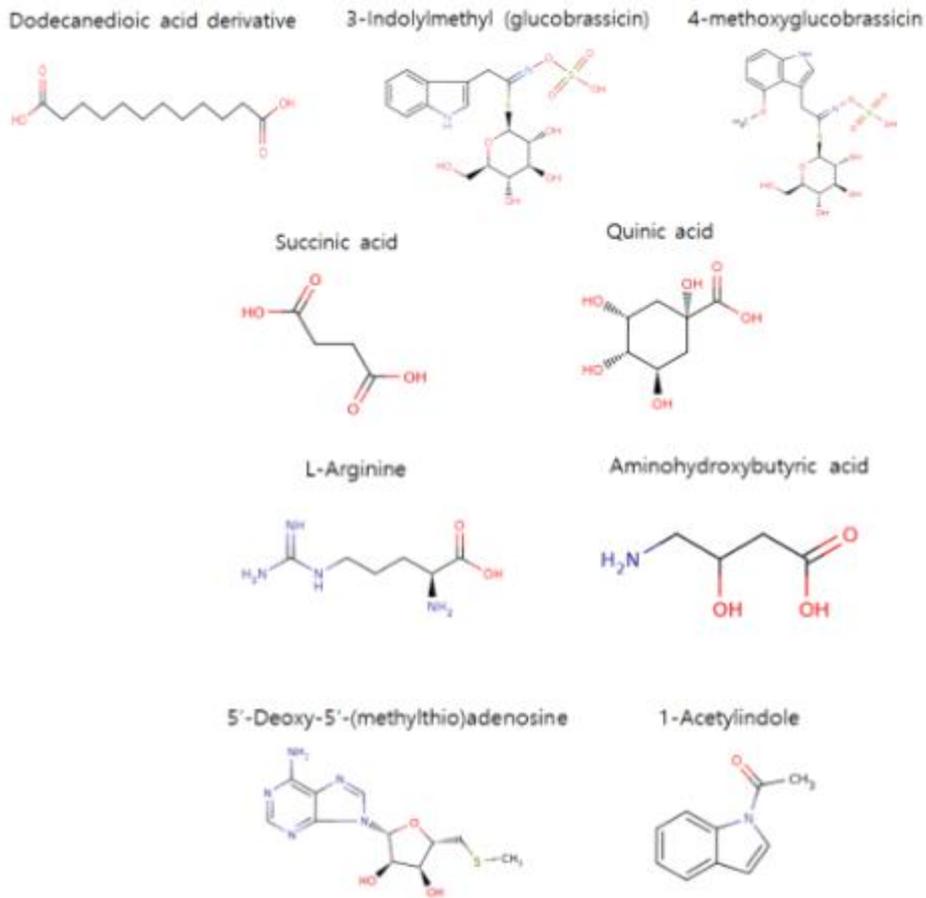


Fig 162. PEF 처리에 의해 변이를 보이는 브로콜리 함유 주요 대사체

다. PEF 처리에 의한 브로콜리 함유 glucosinolate 관련 대사체 변이

- 브로콜리에는 아래 그림과 같은 다양한 구조의 glucosinolate 계열의 화합물이 함유되어 있는 것으로 알려지고 있음. 이들 대사체들을 대상으로 targeted analysis를 수행한 결과, PEF 처리에 의한 유의적인 변이를 확인할 수 있었음.

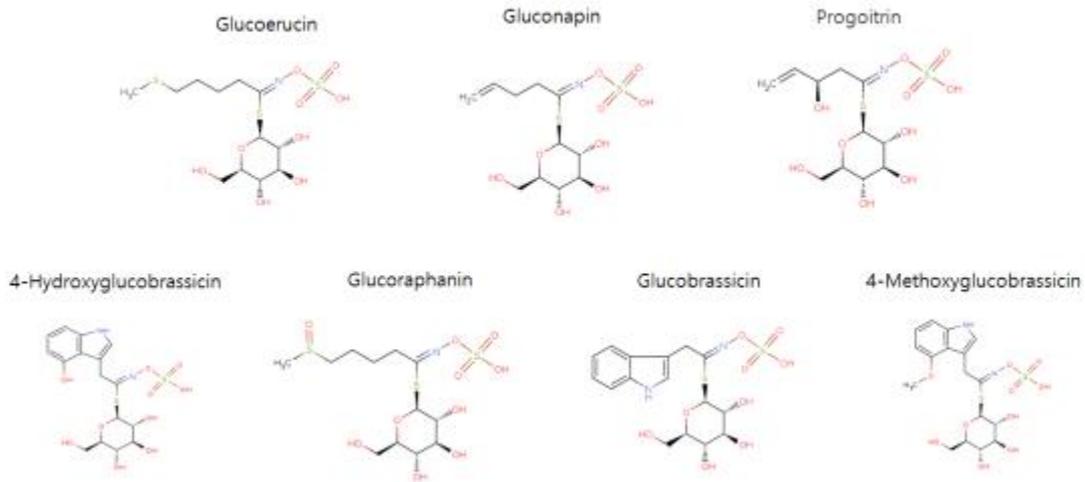


Fig 163. Glucosinolate 계열 화합물들의 구조

- 브로콜리의 꽃부위에 함유된 주요 glucosinolate 대사체들의 변이 수준을 비교한 결과, PEF 처리조건 1을 제외한, PEF2 와 PEF3 조건에서 모두 유의미한 감소되는 것이 확인 되었음. 이는 PEF 처리에 의한 물리적 혹은 myrosinase의 활성화에 의한 반응에 의한 전환이 이루어진 것으로 예측되어지는 결과임.
- 줄기부위에서도 주요 glucosinolate 대사체들이 PEF 처리에 의해 감소하는 경향을 나타 내었으며, 꽃부위와 같이 PEF2 와 PEF3 조건에서 더 많은 변화가 나타남을 확인할 수 있었음.

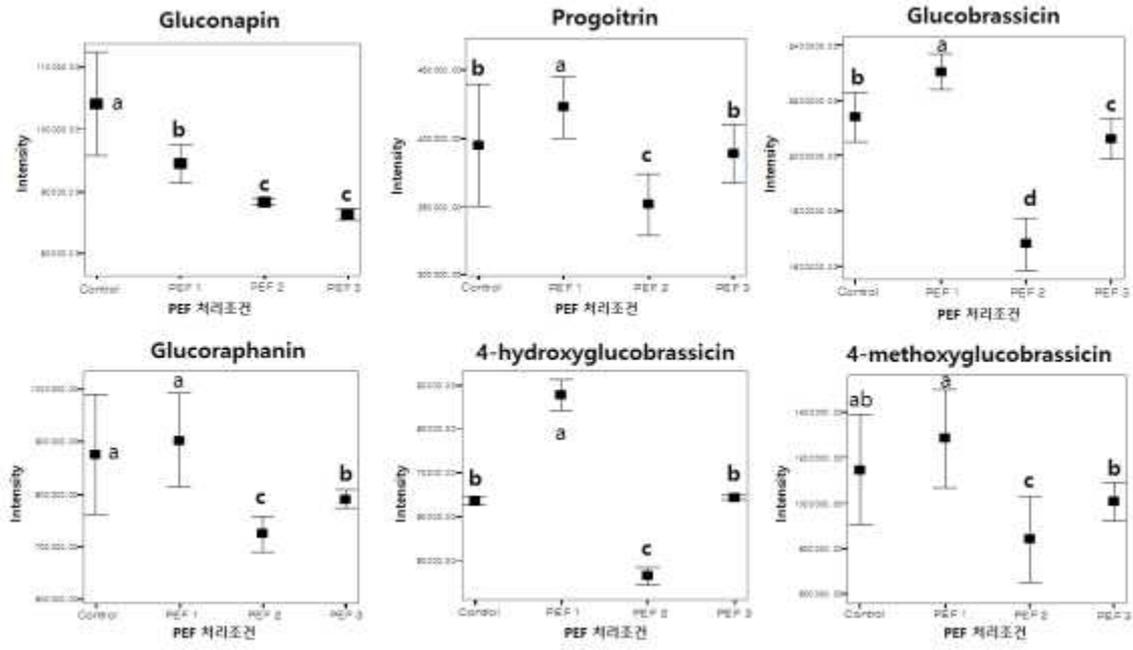


Fig 164. 브로콜리 꽃부위의 주요 glucosinolate 대사체 변이 수준 비교

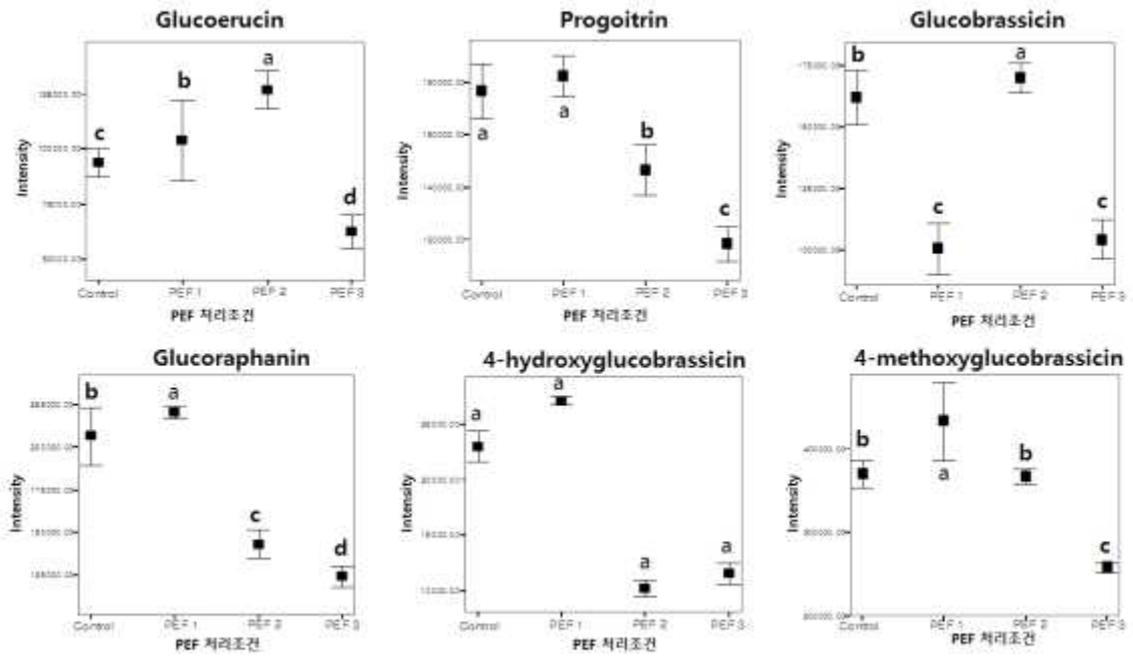


Fig 165. 브로콜리 줄기부위의 주요 glucosinolate 대사체 변이 수준 비교

10. 연속형 펄스처리조 설계·제작 및 적용

○ 1차년도 연구결과 펄스처리에 의한 브로콜리 중 설폴라판의 증가는 배치(Batch)형 펄

스처리조를 이용한 실험을 통해 확인하였음.

- 당해연도의 연구에서는 펄스처리가 설포라판 이외의 Succinate, Quinic acid, Dodecanedioic acid 유도체, Aminohydroxybutyric acid, L-Arginine 등의 대사체를 형성할 수 있는 것으로 확인되었음.
- 이러한 결과의 산업화 적용을 위해서는 연속식 펄스처리조를 이용한 파일럿 스케일의 장치제작과 이를 통한 검증이 필요하며, 이에 따라 실험실에서 운영할 수 있는 연속형 펄스처리조 (Continuous PEF treatment chamber)를 설계하였음.
- 연속형 펄스처리조는 브로콜리, 무 등 십자화과 고체식품에 펄스처리를 연속적으로 전해줄 수 있어야 하므로 다음 조건을 충족하도록 설계되었음.
 - 최대 2.5 kV/cm 의 펄스전기장을 고체 시료에 전달할 수 있는 티타늄 일렉트로드의 장착(Gap=8.0 cm)
 - 연속식 처리가 속도조절형 컨베잉 장치의 포함
- 연속형 펄스처리조는 설계(Fig. 60) 및 제작이 완성되었으며 중앙대학교 식품공학과 연구실에 설치가 완료되었음(Fig. 61).

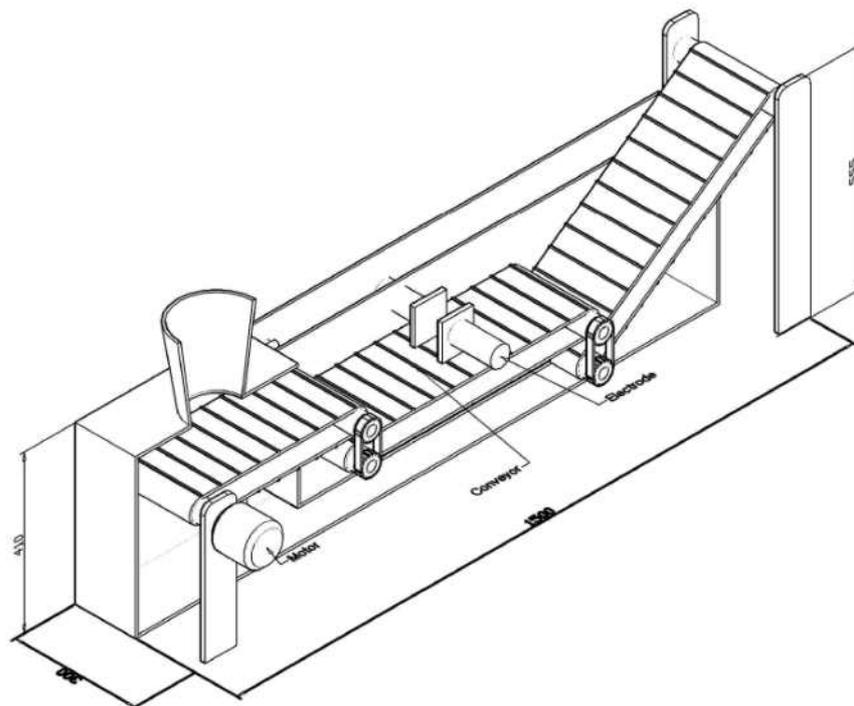


Fig 166. 연속형 펄스처리조 (Continuous PEF treatment chamber) 의 개략도



Fig 167. 제작 완료된 연속형 펄스처리조의 시료투입구구 및 이송부분 (좌); 측면부분 (우)

11. PEF 연속공정 적용 및 기능성분 대사체분석

가. 연속형 PEF 처리 브로콜리 함유 대사체 추출

- 2차년도에서 제작된 연속형 펄스처리조를 이용하여 브로콜리를 연속식으로 처리하고 처리이후 대사체 분석을 실시하였음.
- 브로콜리 PEF 가공 처리 조건과 물리처리 방법에 따른 대사체의 변이를 분석하고자 선행 연구를 바탕으로 3가지 조건을 적용하였음. 2 kV/cm, 50 Hz로 처리 시간을 달리하여 PEF condition 1(10초/500 pulse), PEF condition 2(30초/1500 pulse), Blanching(boiling, 2 min)의 조건으로 브로콜리를 꽃 부위와 줄기 부위로 나누어 가공 처리하였음. 동결 건조된 시료 2 g을 70% 메탄올에 넣고 30분 동안 sonication을 실시한 후, 70°C shaking water bath에서 20분간 대사체를 추출하였음. 이후 원심분리(12000 rpm, 15분)로 상등액을 분리한 후, filtering 및 용매 제거하여 분석에 이용하였음.

나. UPLC 및 LC-MS/MS 기반 브로콜리 함유 대사체 변이 분석

- 브로콜리 시료는 꽃부위와 줄기부위로 나누어 분석하였음.
- 브로콜리 함유 대사체의 변이를 분석하기 위해, 우선 UPLC를 이용하여 전체 대사체들의 변화를 비교, 관찰하였음. 아래 그림과 같은 분석 조건을 사용하였고, 물질의 검출은 앞에서 확인된 특이 흡광도인 280과 320 nm의 조건을 적용하였음.
- 이후 전체 대사체들의 변이를 명확히 분석하기 위하여, LC-MS/MS 분석을 아래의 조건에서 수행하였음. 모든 분석은 이후의 통계처리를 위해 최소 3반복 이상 수행하고, 결과

들을 비교, 분석하였음.

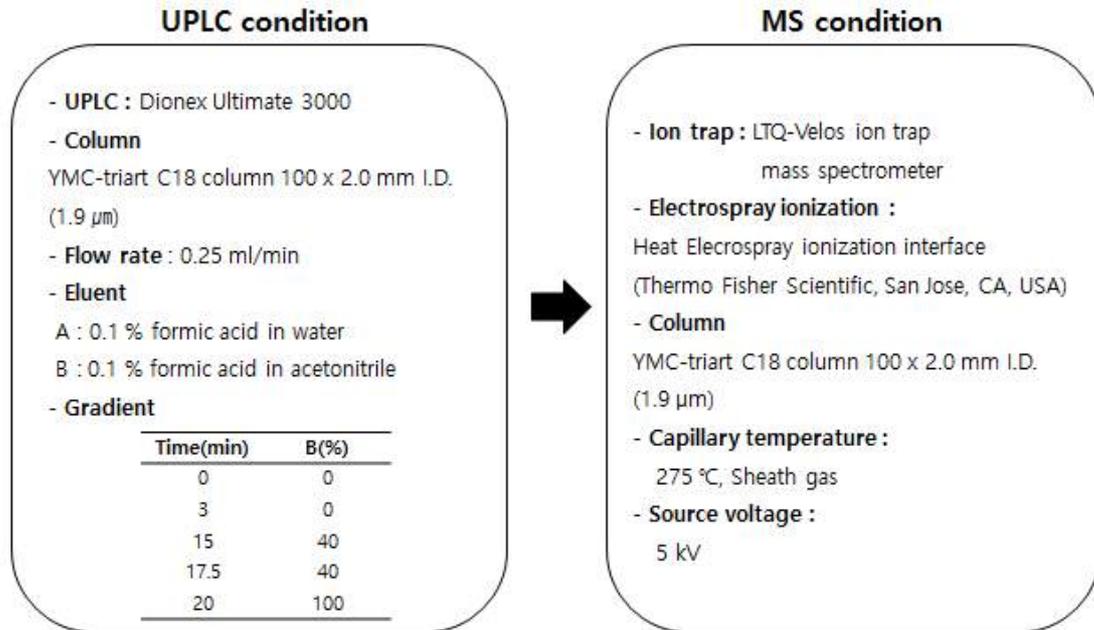


Fig 168. UPLC 및 LC-MS/MS 분석 조건

- UPLC 분석 결과, 아래 그림에 나타난 바와 같이 280 nm에서는 4, 6, 13분대에서 PEF 처리에 의해 intensity에 유의적인 변화가 관찰되었고, 320 nm에서는 4, 13분에 대에서 유의적인 변화가 나타남이 확인되었음. 이러한 변화는 정도의 차이는 있었으나 꽃과 줄기부위 모두에서 동일하게 관찰되어, 연속형 PEF 처리에 의한 활성 대사체들의 변이와 관련이 있을 것으로 예측되었음.
- 대사체들의 LC-MS/MS 분석은 positive와 negative ion mode 모두에서 수행하였음. 아래 그림에서 보는 바와 같이, TIC profile에서 일부 변이가 관찰되기는 하였으나, 정확한 변이 profile의 확인은 이후의 대사체 변이 분석 과정에서 분석될 수 있었음.

<꽃 부위>

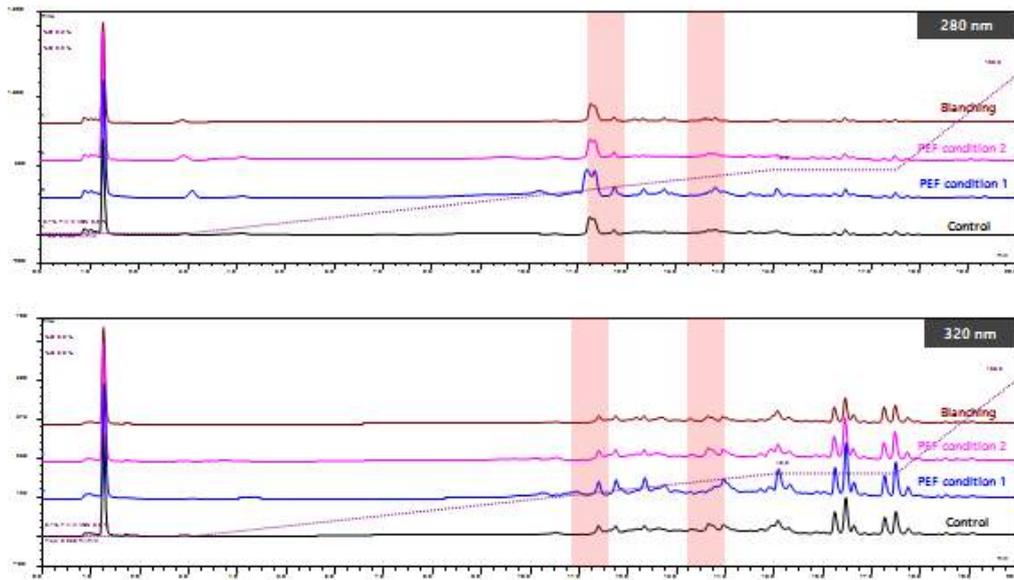


Fig 169. 연속형 PEF 처리 브로콜리 꽃부위 추출물의 UPLC 크로마토그램

<줄기 부위>

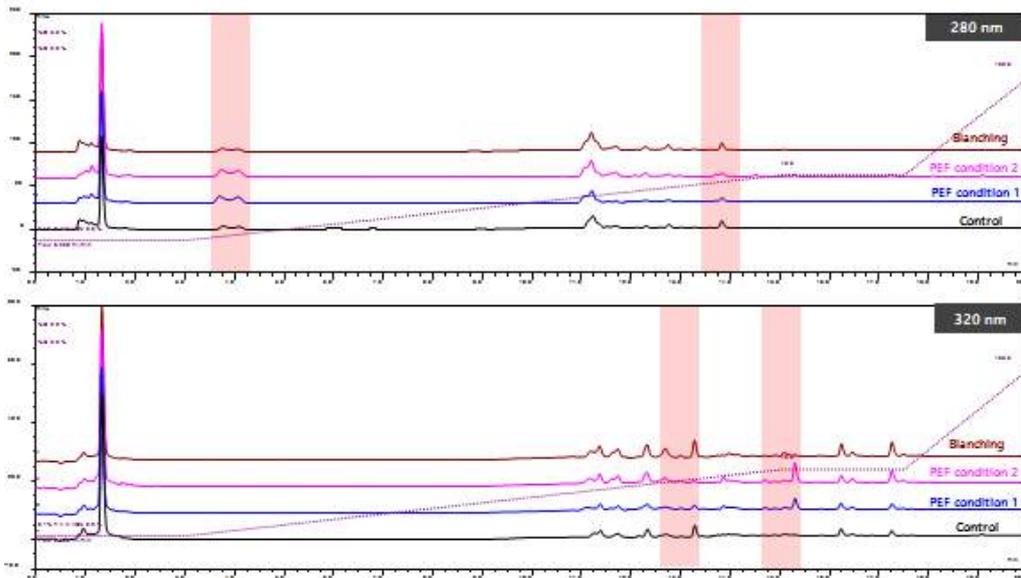
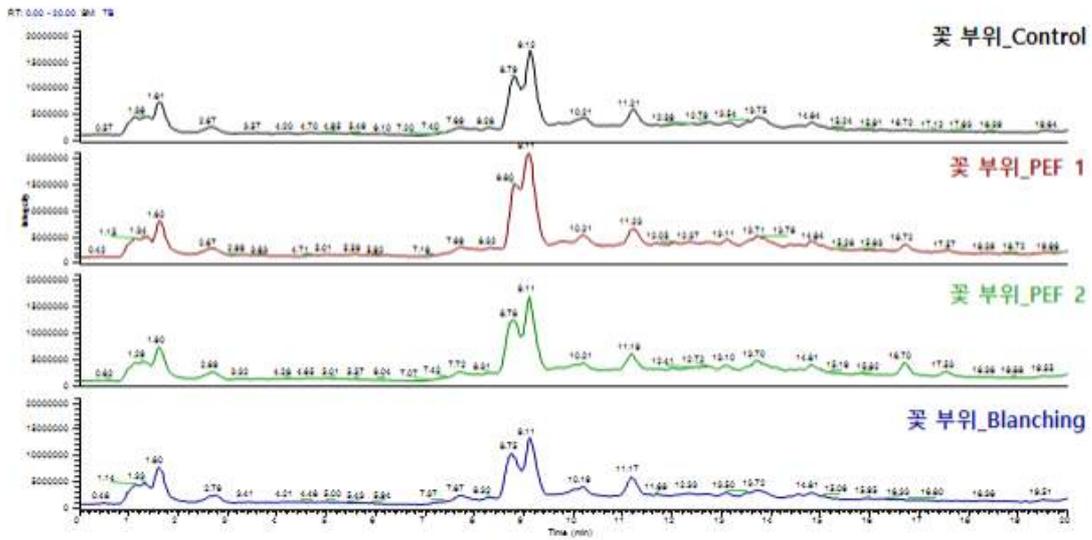


Fig 170. 연속형 PEF 처리 브로콜리 줄기부위 추출물의 UPLC 크로마토그램

<Negative ion mode>



<Positive ion mode>

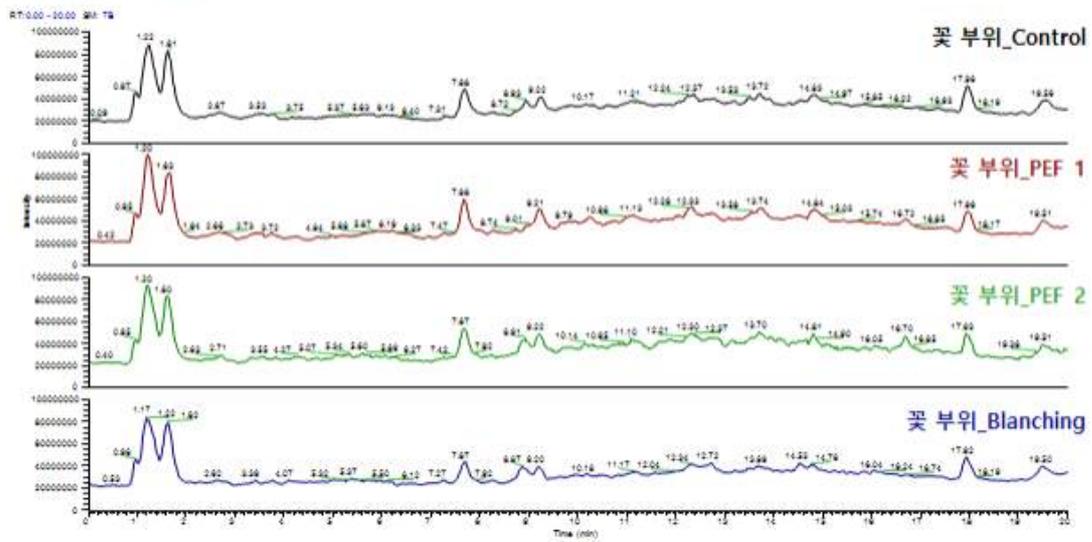
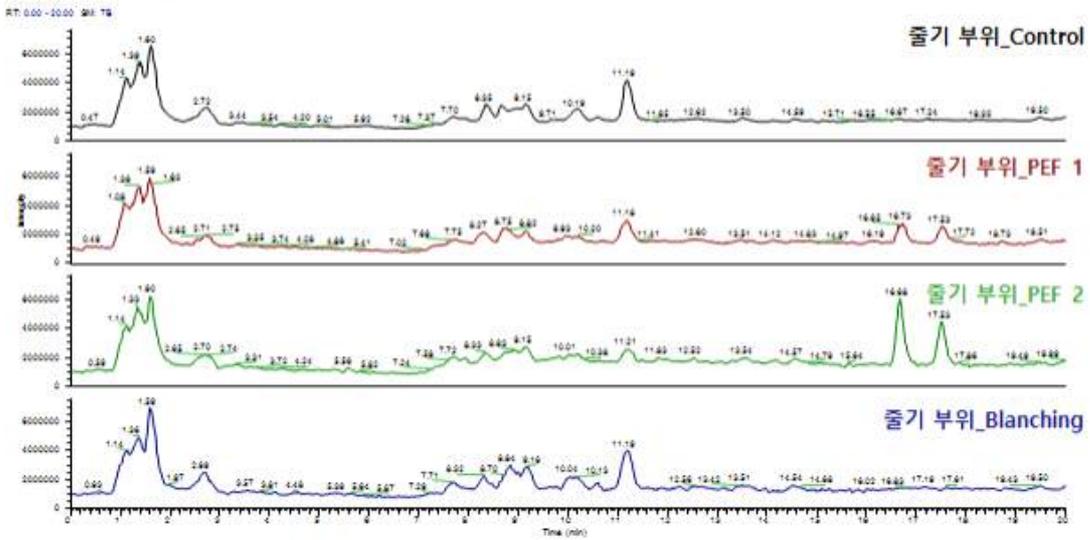


Fig 171. 연속형 PEF 처리 브로콜리 꽃부위 추출물의 LC/MS TIC 크로마토그램

<Negative ion mode>



<Positive ion mode>

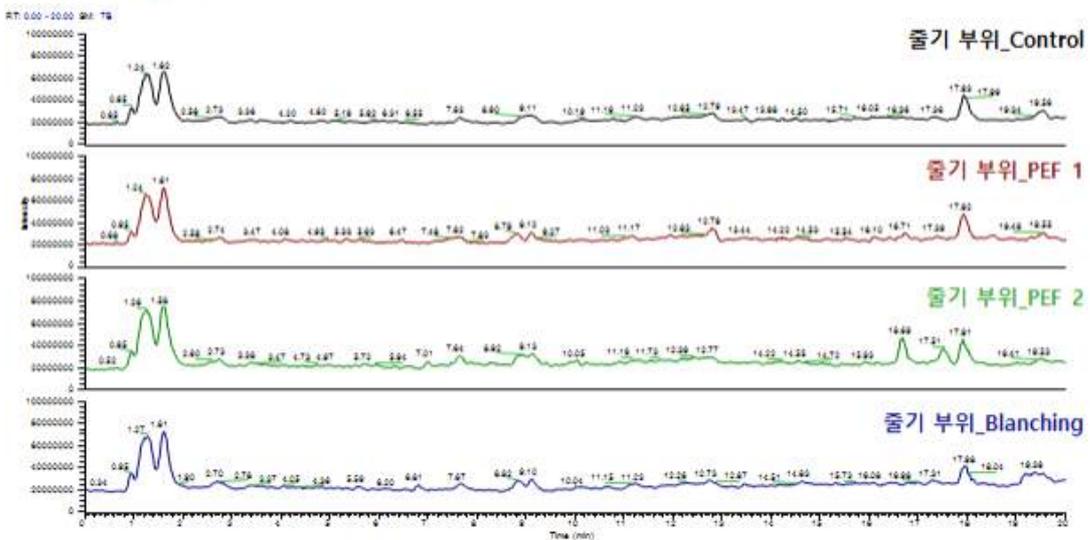


Fig 172. 연속형 PEF 처리 브로콜리 줄기부위 추출물의 LC/MS TIC 크로마토그램

다. 브로콜리 함유 대사체 동정을 위한 다변량 통계분석

○ LC-MS/MS 분석에 나타난 브로콜리 함유 대사체들의 변이를 규명하기 위해, 전체 대사체 분석 결과를 바탕으로 다변량 통계분석을 실시하였음.

○ 3반복 측정된 MS 결과 data들의 alignment를 위해, mz-mine 2 software(Steno Diabetes Center, Gentofte, Denmark)를 이용하였음. 이때, m/z width는 0.25 m/z, frame

time width는 0.2 min, alignment minimum intensity는 negative ion mode 경우 꽃, 줄기 부위 모두 1000, positive ion mode 경우 10000으로 parameter를 지정하여 processing을 수행하였음.

- Peak alignment 수행 결과, 꽃부위의 경우 negative ion mode에서 총 531개, positive ion mode에서는 총 511개의 프레임이 검출되었고, 줄기부위는 negative ion mode에서 총 223개, positive에서는 총 267개의 프레임이 검출되어, 이들을 대상으로 이후 통계처리 및 분석을 진행하였음.
- 대사체들의 변이 규명을 위한 다변량통계분석은 SIMCA version 14.0(Umetrics, Sweden)를 이용하여 진행하였음. PCA(Principal component analysis)와 OPLS-DA(Orthogonal partial least squared-discriminant analysis) 분석을 실시하였고, 먼저 PCA 분석을 수행하여 PEF 가공 조건별 유사성과 차이성을 확인하여 경향을 분석하였으며, OPLS-DA를 통해 차이를 최대화하여 유의성을 갖는 성분의 동정 및 screening을 진행하였음.
- PEF 처리에 따른 브로콜리의 대사체 변이 분석을 위한 loading plot과 이들에 대한 PCA 분석 결과는 아래 그림들과 같았음.
- 꽃부위 함유 대사체들에 대한 분석 결과, 각 처리군별로 유의하게 상이한 대사체들을 함유하고 있음을 확인할 수 있었음. 대조군(Control)과 비교하여, 처리군들은 PC1을 기준으로 명확히 구분되는 것을 확인할 수 있었음.
- 줄기부위 함유 대사체들의 분석 결과에서도 PEF 처리에 의한 변이를 확인할 수 있었음. 대조군과 처리군들은 역시 PC1을 기준으로 구분되어 대사체에 유의적인 변이가 있음을 나타내었음.
- 단순 열처리 공정의 블랜칭 처리한 시료들의 경우, PEF 처리군과 확연히 다른 대사체 분포를 나타내어, PEF 처리에 의한 특이 성분의 증감이 영향을 받을 수 있음을 나타내었음.

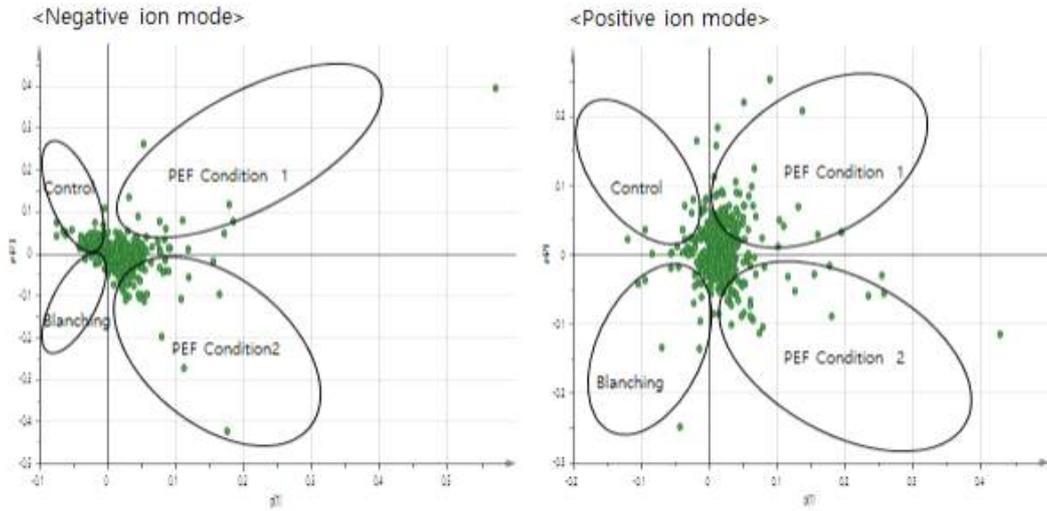


Fig 173. 브로콜리 꽃부위 대사체의 변이 분석을 위한 loading plot

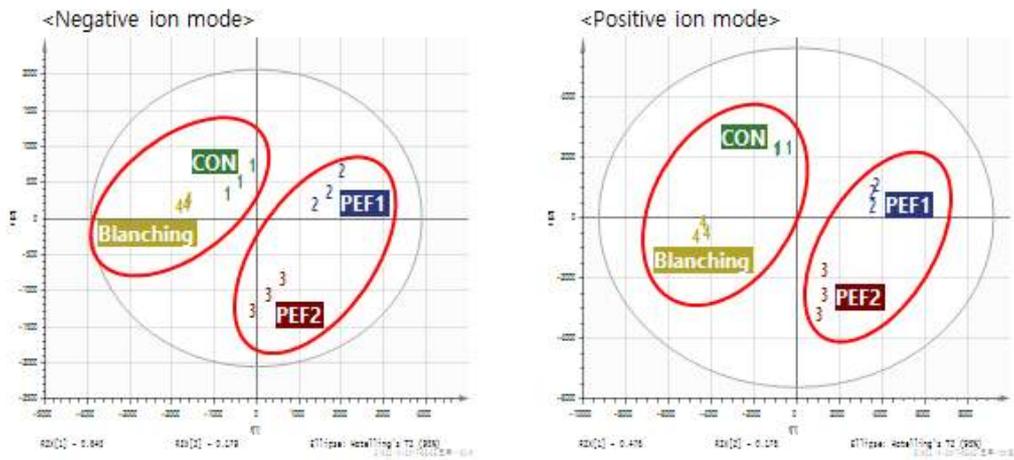


Fig 174. 브로콜리 꽃부위 함유 대사체의 변이 규명을 위한 PCA(Principal Component Analysis) 분석

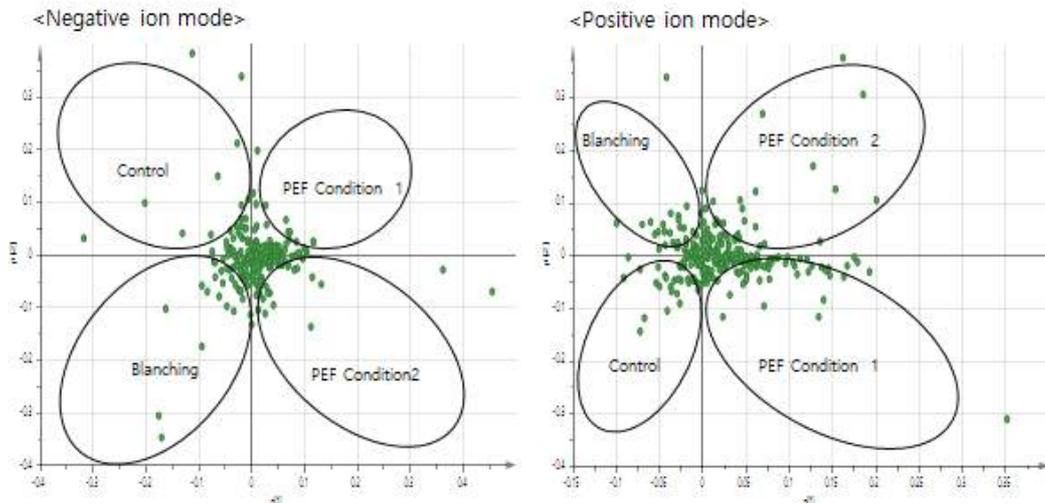


Fig 175. 브로콜리 줄기부위 대사체의 변이 분석을 위한 loading plot

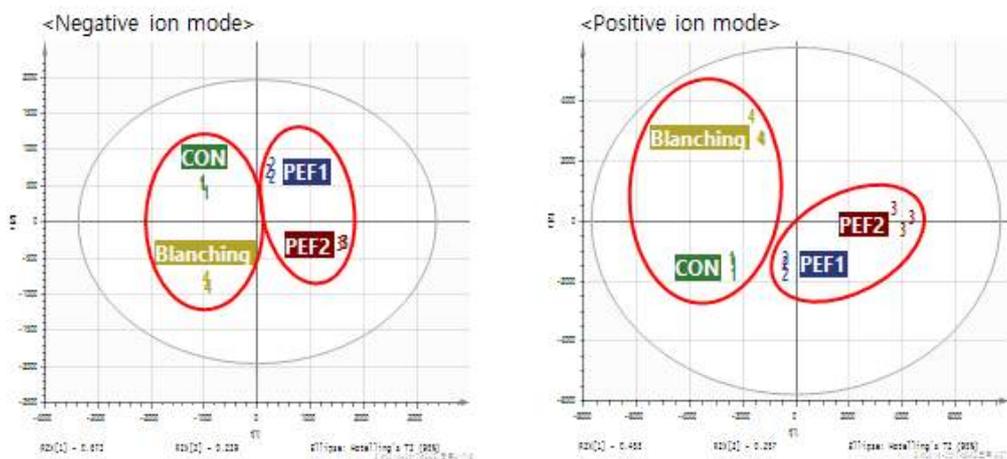


Fig 176. 브로콜리 줄기부위 함유 대사체의 변이 분석을 위한 PCA(Principal Component Analysis) 분석

- 앞의 PCA 분석에 나타난 바와 같이, PEF 처리에 의해 각 처리군별로 상이한 대사체가 존재함을 확인하였음. 이러한 대사체의 변이를 규명하기 위해, 이를 일으키는 주요 대사체들의 존재를 VIP(Variable importance in the projection) value를 기준으로 선별하였음.
- 아래 그림은 브로콜리의 꽃과 줄기 함유 대사체들 중 PEF처리에 의한 변이에 기여한 VIP value가 1이상인 주요 대사체들을 나타낸 것임. 꽃부위의 경우, negative ion mode에서는 총 77개, positive ion mode에서는 총 77개가 선별되었고, 줄기부위에서는 negative ion mode에서는 총 42개, positive ion mode에서는 총 60개의 대사체들이 선별

되었음. Raw data와 비교할 때, PEF 처리에 의해 약 15% 가량의 대사체에 유의적인 변이가 발생한 것을 확인할 수 있었음.

○ PEF 처리에 의한 대사체들의 변이는 아래의 heat map에 나타난 바와 같이 증가, 감소의 경향이 다양하게 나타나는 것을 확인할 수 있었음.

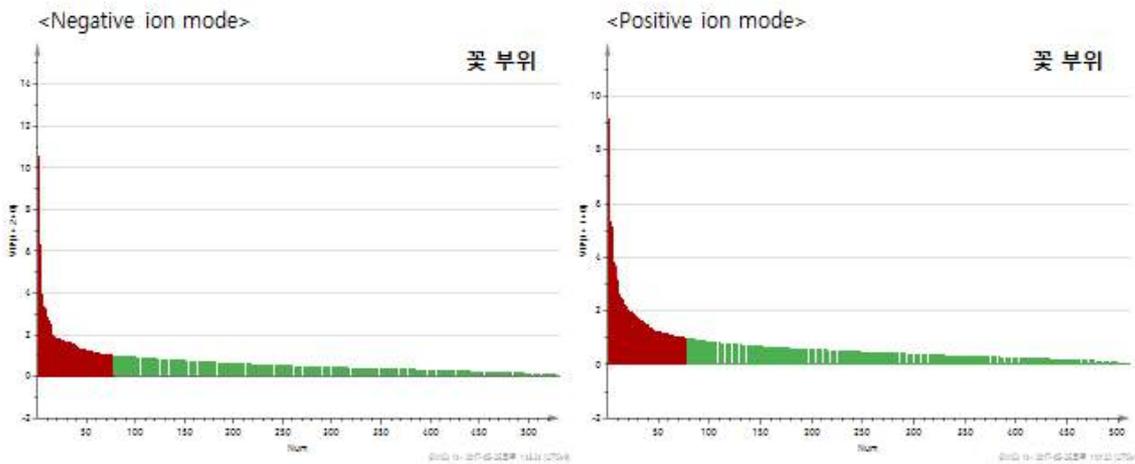


Fig 177. 브로콜리 꽃부위 함유 대사체들의 VIP value(VIP>1)

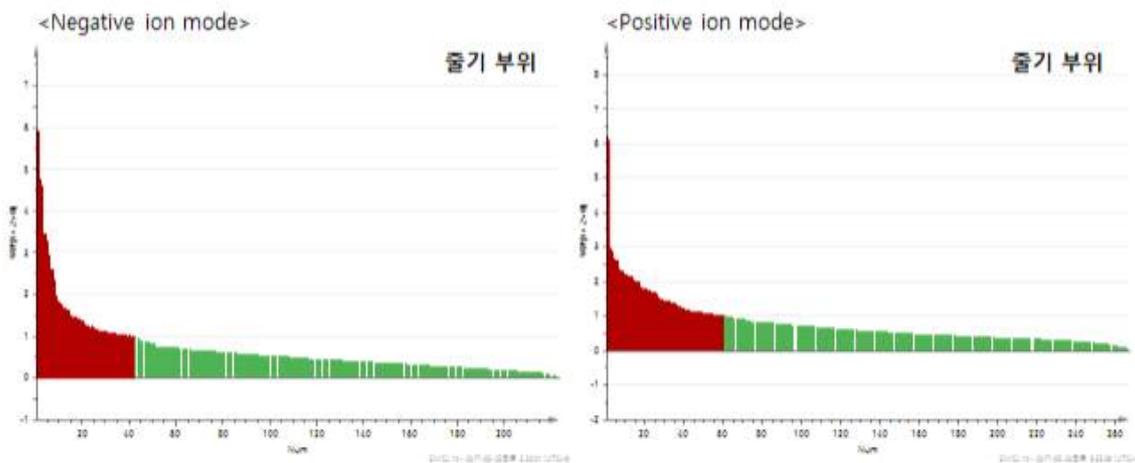


Fig 178. 브로콜리 줄기부위 함유 대사체들의 VIP value(VIP>1)

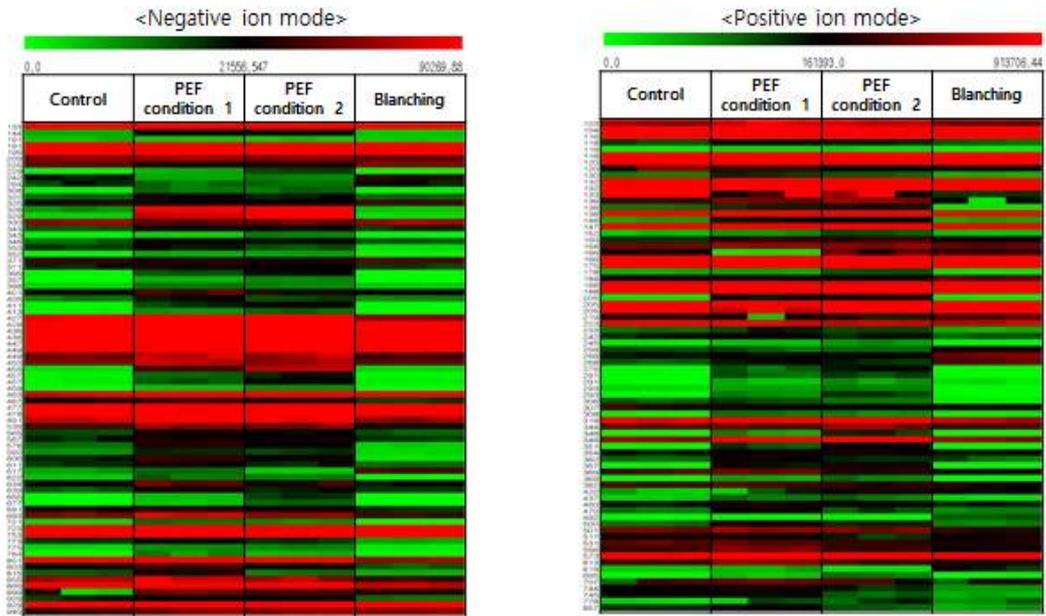


Fig 179. 브로콜리 꽃부위 대사체의 변이를 정리한 Heat map

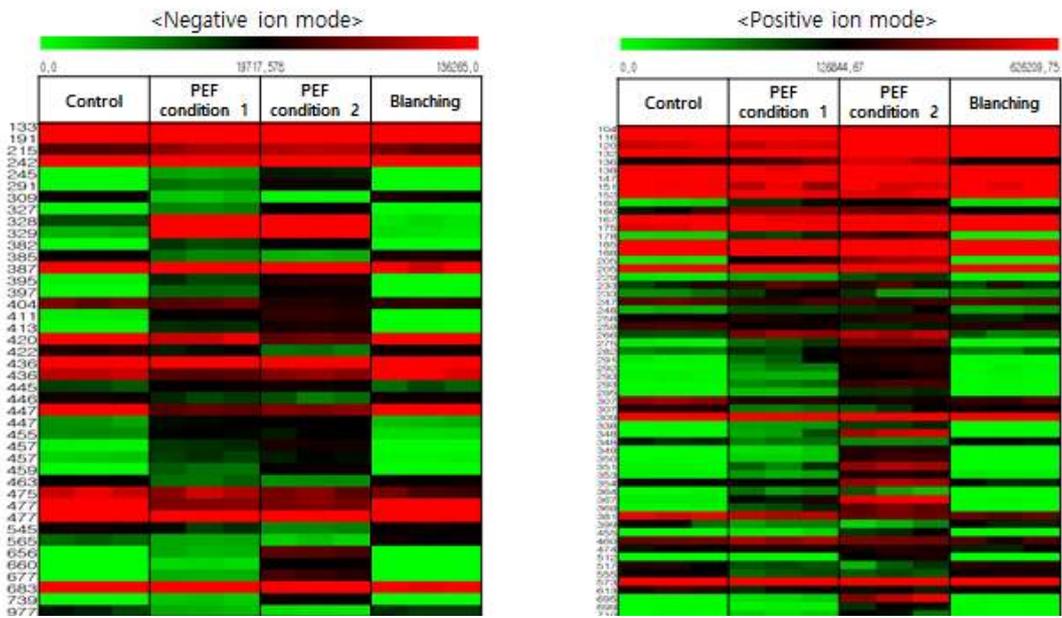


Fig 180. 브로콜리 줄기부위 대사체의 변이를 정리한 Heat map

○ 연속형 PEF 처리에 의한 대조군 대비 유의적 변이가 나타난 대사체는 다음과 같았음.

Table 73. 연속형 PEF 처리에 의한 브로콜리의 주요 변이 대사체

<Negative ion mode>

| m/z | RT | VIP | p(corr) |
|--------|-------|------|---------|
| 144.09 | 13.59 | 2.02 | 0.97 |
| 395.20 | 16.72 | 1.94 | 0.95 |
| 306.17 | 11.19 | 1.55 | 0.99 |
| 592.18 | 14.14 | 1.33 | 0.98 |
| 721.22 | 17.35 | 1.26 | 0.95 |
| 398.21 | 13.21 | 1.25 | 0.98 |
| 352.18 | 11.22 | 1.21 | 0.99 |
| 775.20 | 8.90 | 1.19 | 0.98 |
| 162.00 | 4.56 | 1.09 | 0.96 |
| 327.12 | 8.42 | 1.07 | 0.99 |
| 541.16 | 16.72 | 1.05 | 0.95 |
| 215.09 | 1.15 | 1.86 | 0.97 |
| 457.34 | 14.84 | 1.04 | 0.97 |
| 447.22 | 1.38 | 1.02 | 0.98 |
| 445.22 | 1.39 | 1.02 | 0.95 |
| 160.00 | 11.13 | 2.25 | 0.97 |
| 290.66 | 16.70 | 1.75 | 0.97 |
| 146.00 | 13.57 | 1.71 | 0.98 |
| 308.09 | 11.18 | 1.42 | 0.97 |
| 136.00 | 2.37 | 1.25 | 0.96 |
| 118.09 | 13.56 | 1.17 | 0.98 |
| 266.09 | 1.33 | 2.45 | 0.97 |
| 160.00 | 15.59 | 1.32 | 0.97 |
| 268.09 | 1.62 | 1.06 | 0.95 |

<Positive ion mode>

| m/z | RT | VIP | p(corr) |
|--------|-------|------|---------|
| 225.09 | 1.22 | 1.94 | -0.99 |
| 242.09 | 1.20 | 1.53 | -0.97 |
| 401.18 | 1.44 | 1.02 | -0.96 |
| 477.11 | 11.18 | 5.02 | -0.95 |
| 477.10 | 10.19 | 2.54 | -0.99 |
| 447.12 | 9.02 | 2.46 | -0.97 |
| 309.09 | 1.61 | 1.39 | -0.98 |
| 385.17 | 10.52 | 1.16 | -0.97 |
| 446.13 | 11.19 | 1.10 | -0.95 |
| 977.15 | 11.19 | 1.02 | -0.96 |
| 307.07 | 1.68 | 1.98 | -0.98 |
| 259.09 | 1.59 | 1.54 | -0.96 |
| 307.07 | 4.95 | 1.42 | -0.95 |

라. 연속형 PEF 처리에 의한 브로콜리 함유 glucosinolate 관련 대사체 변이

- Targeted analysis를 기반으로 PEF 처리에 브로콜리 줄기부위에서의 glucosinolate 계열 대사체들의 유의적인 변이를 비교하였음.
- 아래 그림에 나타난 바와 같이, 주요 glucosinolate 대사체들이 PEF 처리에 의해 감소하는 경향을 나타내었음. 이는 PEF 처리에 의해 활성화된 myrosinase의 작용에 의해 glucosinolate 화합물들의 전환이 일어난 것으로 예측되었음.

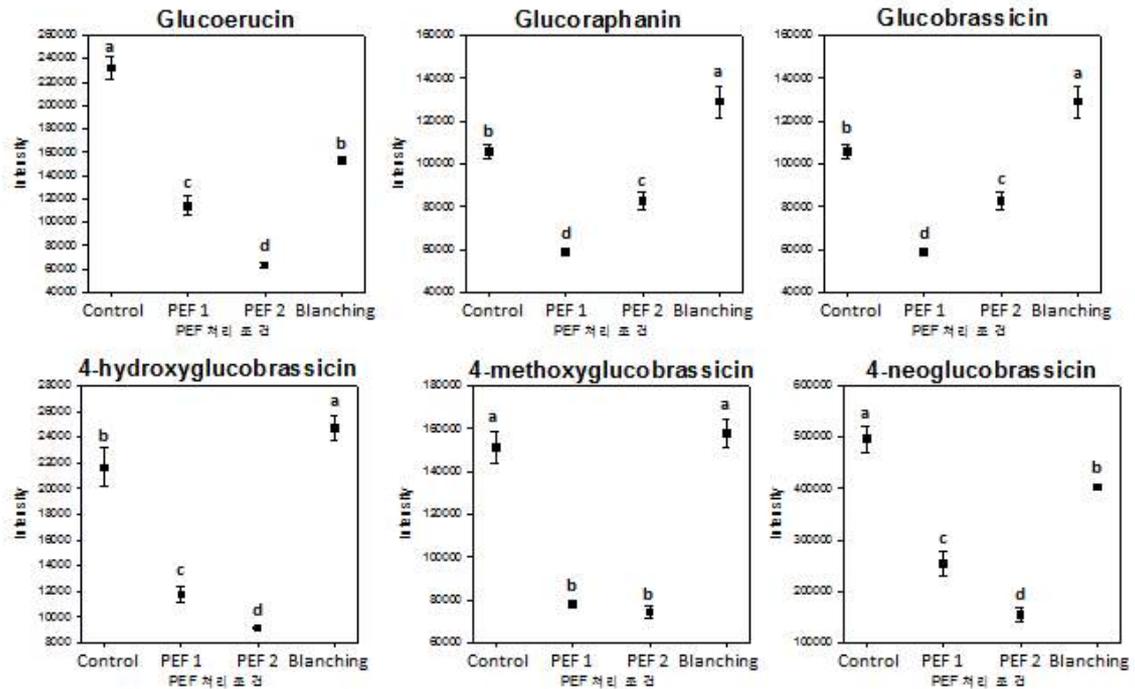


Fig 181. 브로콜리 줄기부위의 주요 glucosinolate 대사체 변이 수준 비교

마. 연속형 PEF 처리에 따른 Glucoraphanin, Glucobrassicin, Sulforaphane 함량

- 선행연구에서 정립된 연속형 PEF의 최적 처리조건(2 kV/cm, 50 Hz, 30초/1500 pulse)에 의한 브로콜리 줄기 내 Glucoraphanin, Glucobrassicin, Sulforaphane 함량의 변화를 분석하였음.
- Glucosinolate 계열인 Glucoraphanin, Glucobrassicin 함량 분석은 동결 건조된 시료 100mg을 70% 메탄올에 넣고 20분 동안 boiling하여 원심분리(12000 rpm, 4°C, 10분)하였음. 상등액을 분리한 잔여물에 70% 메탄올을 넣고 5분 간 교반한 뒤 원심분리 하여 상등액을 앞선 상등액에 더해 농축하였음. 농축액은 Bio-Spin chromatography column (Bio-Rad Co., USA)과 aryl sulfatase (EC 3.1.6.1, type H-1 from *Helix pomatia*)를 이용하여 desulfation한 후 filtering 하여 분석에 이용되었음.
- Sulforaphane 함량 분석은 동결 건조된 시료 5g과 sodium sulfate를 methylene chloride에 넣고 30분 동안 sonication을 실시한 후, 28°C shaking incubator에서 24시간 동안 추출하였다. 이후 Whatman no.1 filter paper로 추출물 분리하였음. 회전식 감압 농축기를 이용하여 용매 제거 후 acetonitrile를 재용해한 후 분석에 이용하였음.
- Desulfo-glucosinolate 동정은 YMC-triart C18 컬럼(100 x 2.0 mm I.D.(1.9 μm))을 이용

하였다. 용매는 물(A)과 20%(v/v) acetonitrile(B)을 이용하여 0-100% gradient 변화로 0.2ml/min 조건에서 분석하였음(총 분석시간 15분). Gradient 조건은 최초 6분까지 A 100%에서 B 100%로 변화시키고 10분까지 B 100% 조건에서 유지시킨 후, 12분까지 다시 A 100% 조건으로 변화시키고 15분까지 유지하여 개별 desulfo-glucosinolates를 분리하였음. 표준물질로 Glucoraphanin, Glucobrassicin을 이용하였음. 각각의 표준물질들은 6.25, 12.5, 25, 50, 100ppm으로 희석한 후 브로콜리 시료와 동일한 방법으로 desulfation 시키고, UPLC로 분리된 피크의 머무름 시간을 이용하여 동정하였으며, 파장 230nm에서의 각 표준물질들의 농도에 따른 피크의 면적을 이용하여 정량분석 하였음.

- Sulforaphane은 YMC-triart C18 컬럼(250 x 4.6 mm I.D.(5 μ m))을 이용하였다. 용매는 물(A)과 acetonitrile(B)을 이용하여 20-100% gradient 변화로 1ml/min 조건에서 분석하였음(총 분석시간 15분). Gradient 조건은 최초 10분까지 B 20%에서 B 60%로 변화시키고 12분까지 B 100%으로 변화시킨 후 15분까지 다시 B 20% 조건으로 변화시켜 sulforaphane을 분리하였음. 표준물질로 D,L-sulforaphane을 이용하였다. 피크의 머무름 시간을 이용하여 동정하였으며, 파장 254nm에서의 각 농도(15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000ppm)에 따른 피크의 면적을 이용하여 정량분석 하였음.
- 가공 공정에 따른 브로콜리의 glucoraphanin 함량을 분석한 결과 Control 586.81 mg/100g Dry Weight, Blanching 240.64 mg/100g Dry Weight, PEF 387.55 mg/100g Dry Weight으로 분석되었음. Glucobrassicin 함량 분석 결과 Control 26.45 mg/100g Dry Weight, Blanching 22.25 mg/100g Dry Weight, PEF 19.27 mg/100g Dry Weight으로 분석되었음.
- 브로콜리의 물리처리 방법에 따른 Sulforaphane 함량을 분석한 결과 Control 2.83 mg/100g Dry Weight, Blanching 0.51 mg/100g Dry Weight, PEF 10.82 mg/100g Dry Weight으로 분석되었음.
- PEF 처리는 브로콜리의 Sulforaphane 함량 증폭에 효과적이었으며, 반대로 Glucosinolate 화합물들은 유의적인 감소를 나타내었음. 브로콜리의 Sulforaphane 함량은 PEF 처리 시 Control과 비교 하였을 때 3.8배 이상 증가가 되었고, 블렌칭 처리한 브로콜리와 비교하였을 때는 21.2배 이상 증폭되었음.

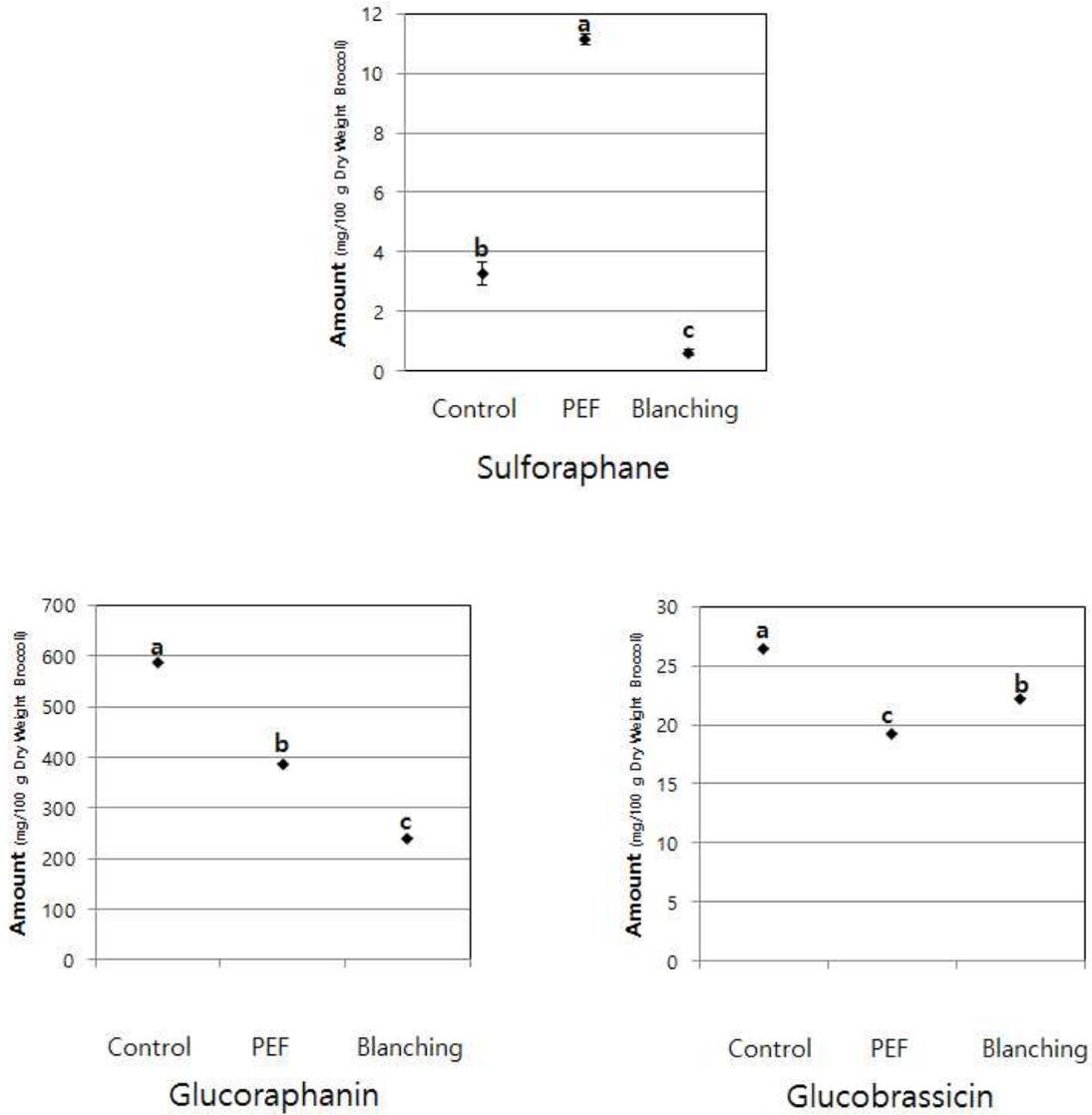


Fig 182. 연속형 PEF 처리에 의한 브로콜리 줄기부위의 Sulforaphane, Glucoraphanin, Glucobrassicin 함량

12. 기능성이 증폭된 브로콜리의 분말화 및 가공적성 연구

- PEF 처리를 통해 기능성이 증폭된 브로콜리를 식품원료로 사용할 경우, 브로콜리를 원형 그대로 사용하거나 분말화 공정을 통해 기존 식품의 원료로 브로콜리를 사용하는 방법이 있음. 기존 가공식품에 브로콜리를 원료로 적용하고자 할 경우, 브로콜리 특유의 거친 식감이 문제될 수 있음.
- 따라서 본 연구에서는 브로콜리 분말의 입도에 따른 식품가공 적성을 확인하기 위해 건조 브로콜리를 입도 별로 분쇄하고 입도의 크기에 따른 물리적 특성과 관능적 특성을 확

인하였음.

가. 브로콜리의 분말화 공정 및 특성분석 방법

(1) 브로콜리 파우더 샘플 준비

- 본 연구에서 사용된 브로콜리는 제주도에서 구입하여 실험에 사용하였음. 브로콜리의 잎 부분은 떼어내고 줄기와 꽃 부분을 사용 하였으며 손질 한 브로콜리는 건조 오븐 (forced convection drying oven, 주식회사 신성)을 사용하여 65℃에서 24시간 건조하였 음.
- 건조된 브로콜리는 믹서기에 마쇄 후 150, 63 μm 크기의 표준체(150-and 63- μm testing sieves, Nonaka Rikaki, Tokyo, Japan)를 이용하여 브로콜리 파우더를 거르고 체를 통 과하지 못한 파우더를 각각 DBP-N150, DBP-N63으로 분류하였음.

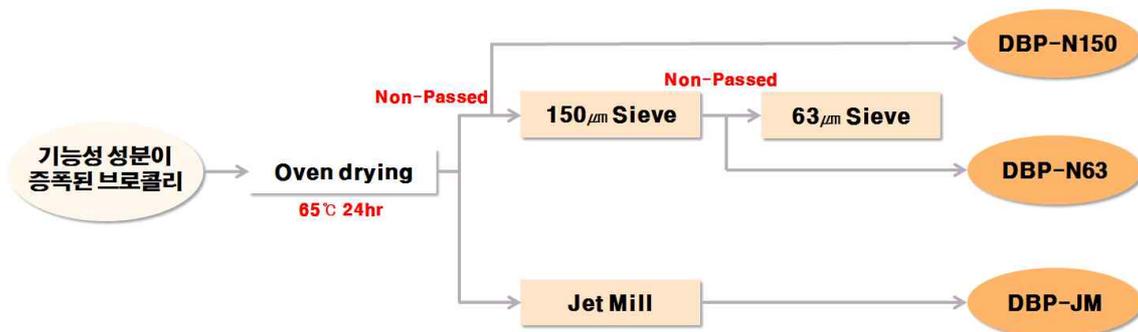


Fig 183. 크기별 브로콜리 파우더 제조 과정

(2) 브로콜리 파우더의 초미세화 및 입도 및 색상분석

- 믹서에 마쇄 한 브로콜리를 Fluidized bed jet mill (CGS 10, Netzsch, Selb, Germany) 을 이용하여 초정밀화 된 브로콜리 파우더(DBP-JM)를 얻었음. Jet-milling 공정 조건 은 milling압력 7 bar, classifier 12,000 rpm으로 설정하였음.



Fig 184. 브로콜리 분말의 초미세화를 위한 Fluidized bed jet mill



Fig 185. 일반적인 분쇄법과 초미세화 분쇄법을 이용해 제조된 브로콜리 파우더 샘플 사진

- 제조된 브로콜리 파우더는 입도분석기 Particle size analyzer using laser diffraction (Mastersizer 3000, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK)을 이용하여 각 샘플의 입자 크기를 측정하였음.
- 제조된 브로콜리 파우더의 색도는 Color different meter (UltraScan PRO, Hunterlab, U.S.A)를 이용하여 측정하였음.

(3) 제조된 브로콜리 분말의 밀도 (Bulk density, Tap density), 및 분산성(Carr index) 측정

- 브로콜리 분말의 Bulk density 는 샘플을 100 ml의 메스실린더에 담아 무게를 칭량하고 분말의 무게를 부피 (100 ml) 로 나누어 계산하였음.
- 분말 사이의 공극을 최소화한 후에 측정하는 Tap density 는 분말 시료를 100 ml의 메스실린더에 담아 입자들 간의 빈 공간을 없애기 위해 똑같은 높이에서 100번 두드린 후 분말의 무게를 부피로 나누어 계산하였음.
- 분말의 유동성을 나타내는 Carr index 는 Bulk density 와 Tap density 를 이용하여 계산하였음(Gierin et al., 1999).

$$Carr\ index(\%) = \frac{Tap\ density - Bulk\ density}{Tap\ density} \times 100$$

- 분말의 유동성을 나타내는 Carr index 값이 0~15%인 경우 분말의 유동성이 좋다는 뜻이고 15~25%는 중간 정도, 25~30%는 좋지 않은 유동성, >30%는 매우 좋지 않은 유동성을 가지고 있다는 것을 의미함.

(4) 제조된 브로콜리 분말의 수용성 지수(Water solubility index), 팽창력(Swelling capacity), 지방 결합력(Fat binding capacity) 측정

- 수용성 지수는 AACC법 44-19의 방법을 참고하여 측정하였다. 50 ml Falcon tube에 샘플 0.5 g(W1)과 증류수를 25 ml 넣고 충분히 분산시킨 뒤 80℃의 항온수조에서 30분간 배양한다. 그 후 8000 rpm으로 15분간 원심분리 하였음. 미리 무게를 잰 알루미늄 접시(W2)에 상청액을 채집하여 24시간동안 100℃의 drying oven에서 건조되었음. 건조 후 알루미늄 접시에 남은 무게(W3)를 측정하여 아래와 같이 계산하였음.

$$WSI(\%) = \frac{W3 - W2}{W1} \times 100$$

- 팽창력은 Robertson et al. (2000)의 방법을 참고하여 측정하였음. 15ml falcon tube에 샘플 0.5 g(W)과 증류수 10ml를 넣어 균일하게 분산시켰다. 그 후 18시간동안 방치하여 얻어진 샘플의 부피(V)를 이용하여 아래와 같이 팽창력을 계산하였음.

$$SC(mL/g) = \frac{Volume\ occupied\ by\ sample\ (V)}{Weight\ dry\ sample\ (W)}$$

- 지방 결합력은 Lin, Humbert, and Sosulski (1974)의 방법을 참고하여 측정하였음. 샘플 2.5 g과 20 ml 옥수수기름을 미리 무게를 잰 50 ml falcon tube에 넣어 5분마다 30초씩 Vertexing을 6번 반복하였음. 그 후 1600 xg로 25분간 원심분리 하여 상등액을 옮겨 담고 잔여물의 무게를 재어 지방결합력을 계산하였음.

$$FBC(g/g) = \frac{(\text{precipitation weight} - \text{dry weight})}{\text{dry weight}}$$

(5) 묘사분석법(Quantitative descriptive analysis, QDA)을 이용한 건조 브로콜리 파우더의 관능 평가

- 브로콜리 파우더의 입자 크기에 따른 관능적 특성을 알아보기 위해 QDA를 통한 관능 평가를 진행하였음. 관능검사는 Sweetness, Particle size, Grassy odor, Fresh 4개의 항목을 기준으로 9점 척도 방법을 사용하여 측정하였음. 묘사분석에 사용되는 매개 변수와 표준물질은 아래의 표와 같음(Table 74).

Table 74. Sensory characteristics and value of standard references products

| Descirptors | Definition | References |
|---------------|--|---|
| Sweetness | Characteristic taste of the sucrose solution | Weak : 0.05% sucrose in drinking water Strong : 0.3% sucrose in drinking water |
| Particle size | The mouthfeel of the particles | Small : plain yogurt Big : perilla seed powder |
| Grassy Odor | Like aroma of freshly cut grass | Weak : 0 Strong : Fresh broccoli (Aroma) |
| Fresh (Taste) | Like fresh vegetables | Weak : 0 Strong : Fresh broccoli (Taste) |

나. 브로콜리의 분말의 물리적 특성분석

(1) 브로콜리 분말의 입도 및 물리적 특성

- 일반 분쇄 처리한 브로콜리 분말은 약 220 μm 의 평균입도를 갖는데 반해 jet-mill 처리한 브로콜리 분말은 6.0 μm 의 평균입도를 나타냈었음. 입자의 크기 분포를 나타내는 Span 값은 모든 처리군에서 2.0~3.1 정도의 값을 나타내어 입자의 크기 분포가 비교적 좁게 형성되어 있음을 알 수 있으며 이는 입자 크기 분배 그래프에서도 확인할 수 있다. 분말입자의 평균크기가 작아질수록 비표면적은 크게 증가하였음(Table 3, Fig. 18).

Table 75. 건조 브로콜리 파우더의 입도분석 결과

| Samples | Dx(10) | Dx(50) | Dx(90) | D[4.3] | Span | Specific Surface Area (m ² /kg) |
|----------|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|--|
| DBP-N150 | 6.75±0.06 ^a | 219.33±0.58 ^a | 450.33±0.58 ^a | 223.67±0.58 ^a | 2.02±0.00 ^c | 1413.33±6.66 ^c |
| DBP-N63 | 3.66±0.03 ^b | 42.57±0.38 ^b | 135.00±0.00 ^b | 57.27±0.21 ^b | 3.09±0.03 ^a | 3145.67±36.30 ^a |
| DBP-JM | 1.44±0.01 ^c | 6.03±0.04 ^c | 14.7±0.01 ^c | 7.19±0.03 ^c | 2.20±0.02 ^b | 8431.33±23.07 ^b |

Values are expressed as the mean ± standard deviation. No significant difference was observed between means (within the same property) designated by the same letter (Duncan's, $p < 0.05$).

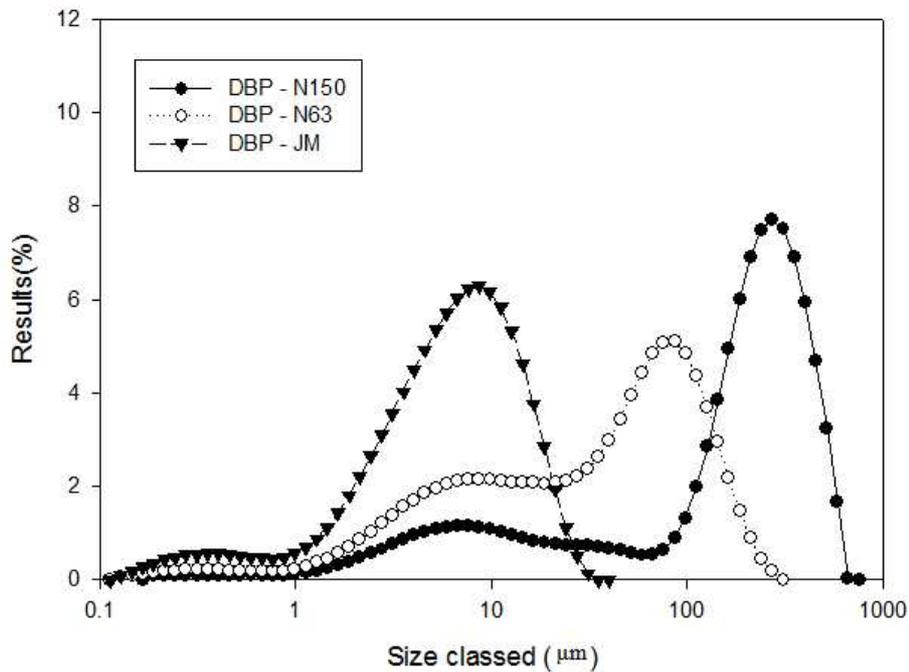


Fig 186. 건조 브로콜리 파우더 샘플의 입자 크기 분배

- 브로콜리 분말의 입도가 작을수록 밝기가 증가하였으며 특히 jet mill 공정을 거친 초미세화 시료의 경우 밝기가 크게 증가하였다. 입자의 크기에 따른 적색도 (a^*)와 황색도 (b^*)의 변화는 미미한 수준이었음.
- 분말소재를 식품원료로 사용할 경우, 밝기(L^*)는 가능하면 높은 값을 갖는 것이 바람직하다. 소재가 어두운 값을 갖게 되면 최종제품의 색상에 영향을 주기 때문임. 따라서 jet-mill을 이용한 초미세화는 브로콜리 분말이 식품 원료로 사용되는 것에 바람직한 특성을 부여함.

Table 76. 건조 브로콜리 파우더의 색도 측정 결과

| Samples | L* | a* | b* | dE* |
|----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------|
| DBP-N150 | 62.08±0.68 ^c | -0.11±0.16 ^a | 20.11±1.02 ^b | - |
| DBP-N63 | 66.56±0.19 ^b | -1.14±0.12 ^b | 23.17±0.52 ^a | 1.42±1.19 |
| DBP-JM | 80.19±0.08 ^a | -1.87±0.04 ^c | 20.29±0.09 ^b | 11.92±0.47 |

Values are expressed as the mean ± standard deviation. No significant difference was observed between means (within the same property) designated by the same letter (Duncan's, $p < 0.05$).

(2) 브로콜리 분말의 가공적성

- 입도에 따른 브로콜리 분말의 밀도(Bulk density, Tap density), 그리고 분말 유동성(Carr index)을 측정하였음(Table 5). 입자의 크기가 감소함에 분말의 Bulk density, Tap density 는 감소하였음. 이는 입자의 크기가 감소함에 따라 입자가 차지하는 비표면적(Specific area)이 급증하고 입자들 사이에 많은 정도의 공간을 포함하고 있음을 의미함.
- 분말 유동성 (Carr index) 은 Bulk density 와 Tap density를 이용하여 계산하였으며 입자의 크기가 줄어들수록 분말 유동성이 나빠지고 있음을 확인 할 수 있음. 이는 공장내부에서 기류식 이동장치 (Pneumatic transportation system) 를 이용하여 초미세화 브로콜리를 이동시킬 경우 입자가 큰 분말을 이동시킬 때에 비해 유동성이 나빠질 수 있음을 의미하나 초미세화 브로콜리가 식품에 배합된 이후에는 별다른 문제가 되지 않음.
- 수용성 지수 측정 결과, 수용성 지수는 입자의 크기가 작아질수록 커지는 경향을 보였음. 이를 통해 입자의 크기가 작을수록 물에 더 잘 녹는다는 것을 알 수 있음. 대부분의 식품원료는 수용성 상태에서 배합되므로 브로콜리 분말의 초미세화는 식품원료로서 유리한 특성을 부여함. 실제 브로콜리 분말은 물에 대해 불용성 성분이 대부분일 것으로 생각되지만 초미세화 공정에 따라 수용성 지수가 상승되는 것은 초미세화 공정 도중 일부 수용성 성분이 보다 쉽게 용출되거나 초미세화 분말이 물에 보다 잘 분산되는 특성에 따른 결과로 판단됨.
- 팽창력은 입자의 크기가 작아질수록 커지는 경향을 보였다. 팽창력은 입자가 물을 얼마나 흡수 할 수 있는지를 나타내는 값이므로 입자의 크기가 작아짐에 따라 비표면적이 상승했기 때문에 팽창력이 상승한다고 추측 할 수 있음. 수분을 흡수하여 팽창하는 식품은 섭취시 포만감을 주어 체중 조절용 식품에 적용할 수 있음.

- 지방 결합력 (Fat binding capacity) 측정 결과, 브로콜리 분말의 입도가 작아짐에 따라 지방 결합력이 상승하는 것을 확인 하였음. 따라서 초미세화 된 파우더가 장내에서 지방이나 콜레스테롤과 결합하여 소화를 도울 수 있을 것으로 예상됨.

Table 76. 브로콜리 분말의 입도에 따른 가공적성

| Samples | Bulk density (g/cm ³) | Tap density (g/cm ³) | Carr Index (%) | Water solubility (%) | Swelling capacity (ml/g) | Fat-binding capacity (ml/g) |
|----------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| DBP-N150 | 0.65±0.02 ^a | 0.83±0.00 ^a | 22.64±2.29 ^b | 34.00±0.00 ^b | 9.30±0.17 ^b | 0.60±0.01 ^c |
| DBP-N63 | 0.38±0.02 ^b | 0.56±0.01 ^b | 35.83±0.51 ^a | 44.67±2.31 ^a | 9.57±0.06 ^b | 0.79±0.01 ^b |
| DBP-JM | 0.22±0.00 ^c | 0.35±0.02 ^c | 36.75±2.95 ^a | 46.67±1.15 ^a | 11.03±0.06 ^a | 0.99±0.01 ^a |

Values are expressed as the mean ± standard deviation. No significant difference was observed between means (within the same group designated by the same letter (Duncan's, $p < 0.05$)).

(3) 묘사분석법을 이용한 브로콜리 분말의 관능 평가

- 묘사분석법을 이용하여 브로콜리 분말에 대한 관능검사를 실시하였음(Table 6). 브로콜리 분말의 입도가 줄어들수록 브로콜리 분말의 단맛 (Sweetness) 의 측정값이 증가하였으며 일반 분쇄법을 이용한 브로콜리 분말의 단맛이 3.0 인데 비해 초미세 브로콜리 분말의 단맛은 4.0 으로 측정되었음.
- 사람의 입 안에서 입자로 느껴지는 느낌(Particle size)은 분말의 입도가 작아질수록 크게 낮아졌음. 일반 분쇄법을 이용한 브로콜리 분말의 입자감이 7.0 수준인데 비해 jet-mill 처리를 거친 초미세 브로콜리 분말의 입자감은 2.7 정도로 대폭 감소되었음. 이러한 결과는 jet-mill 공정을 거쳐 브로콜리 분말의 입자가 크게 작아지며 특유의 거친 식감이 거의 상쇄되었음을 보여줌. 또한 입도 분석을 통한 기계적인 분석값과 관능검사를 통한 분석 값이 잘 일치함을 보여줌.
- 신선한 브로콜리와 비교했을 때의 향 (Grassyness) 의 경우 분말의 입도가 작아질수록 증가하는 것을 확인하였음. 신선한 브로콜리의 향과 비교했을 때 일반 분쇄법을 이용한 브로콜리 분말의 향이 3.8 수준이었으나 jet-mill 처리를 거친 초미세 브로콜리 분말의 향기는 5.2 점으로 유의적으로 증가했음. 이러한 결과는 jet-mill 공정을 거쳐 브로콜리 분말의 입자가 크게 작아지고 동시에 표면적이 늘어나며 브로콜리의 향기성분이 보다 쉽게 분산되는데 따른 것으로 판단됨.

Table 77. 브로콜리 분말의 관능적 특성분석

| Attributes | Sweetness | Particle Size | Grassy | Fresh |
|------------|-----------|---------------|-----------|-----------|
| DBP-N150 | 3.00±1.67 | 7.00±1.41 | 3.83±1.97 | 4.17±1.17 |
| DBP-N63 | 3.33±2.07 | 4.17±0.75 | 4.33±1.37 | 5.00±1.10 |
| DBP-JM | 4.00±1.67 | 2.67±0.82 | 5.17±2.32 | 4.67±2.25 |

Values are expressed as the mean ± standard deviation. No significant difference was observed between means (within the same property) designated by the same letter (Duncan's, $p < 0.05$).

13. 기능성이 증폭된 브로콜리의 초미세 분말을 이용한 식품제조

- PEF 처리를 통해 기능성이 증폭된 브로콜리를 건조한 후 분말화 하였음. 브로콜리 분말을 식품 소재화 하기 위해서는 브로콜리 특유의 거친 식감을 최소화 하는 것이 필요하며 이를 위해 Jet-mill을 이용한 초미세화 기술을 적용하였음.
- 부드러운 식감이 중요한 가공식품에 초미세 브로콜리 분말을 적용하는 실험을 수행하였다. 브로콜리 분말이 적용될 대상식품으로는 두부와 스펀지케익을 선정하였음.

가. 브로콜리의 분말을 첨가한 두부의 제조와 특성

(1) 브로콜리 분말이 첨가된 두부의 제조

- 두부의 제조를 위해 12시간 이상 침지시킨 백태 300 g을 물 900 ml와 함께 마쇄하여 두부와 비지로 분리함. 분리된 두유에 더운 물 400 ml와 두유량의 0.5%에 해당하는 브로콜리 분말을 넣고 100℃에서 10분간 가열함. 두유가 70~80℃로 식었을 때 응고제 ($MgCl_2$) 를 첨가하고 가볍게 저어준 후 뚜껑을 닫고 20분간 정치함.
- 두부 상자를 물로 적시고 물에 적신 무명천 한겹을 두부상자에 감. 정치가 완료된 응고액은 두부 틀에 붓고 무명천을 잘 정리해 덮음. 약 3 kg의 무게 추를 만들어 30분간 압착시킴. 성형된 두부를 물속에 침지하여 식힌 후 두부를 완성함.
- DBP-N150, DBP-N63, DBP-JM을 첨가하여 제조한 두부를 각각 TDBP-N150, TDBP-N63, TDBP-JM이라고 명명하였음.



Fig 187. 건조 브로콜리 파우더를 첨가한 두부의 제조 과정

(2) 브로콜리 분말이 첨가된 두부의 수분함량, 고형분함량, 관능적 특성 분석방법

○ 완성된 두부를 약 1 cm × 1 cm × 1 cm의 정육면체로 잘라 항량을 구한 weighing dish에 담고 무게를 칭량함. 그 후 105°C에서 항량이 될 때까지 건조 하여 건조 후 무게를 칭량하고 아래의 식을 이용하여 고형분 함량과 수분 함량을 구하였음.

$$\text{수분 함량 (\%)} = \frac{W_1 - W_2 (g)}{W_1 - \text{Weighing Dish (g)}} \times 100$$

$$\text{고형분 함량 (\%)} = 100 - \text{수분함량 (\%)}$$

○ 두부의 수득율 (Yield, %) 은 두부 응고 전 생산된 두유의 무게와 완성된 두부의 무게를 이용하여 계산하였음.

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{Tofu weight (g)}}{\text{Soy milk Weight (g)}} \times 100$$

○ 브로콜리 파우더를 첨가한 두부의 관능 평가는 브로콜리 분말을 첨가한 두부의 외형적인 특성과 관능적인 특성을 비교하였음. 브로콜리 분말을 첨가하지 않은 일반 두부로 평가의 기준을 제시하고 평가 결과는 패널들이 느낀 특성 중 공통적인 부분을 서술하였음.

(3) 브로콜리 분말이 첨가된 두부의 수분함량, 고형분함량, 관능적 특성 결과

- 브로콜리 분말을 첨가한 두부의 수율은 대조군 두부의 수율과 같았으며 첨가된 브로콜리 분말의 입자 크기에도 영향을 받지 않았음. 이러한 결과는 브로콜리 분말의 첨가량이 적었기 때문이라고 생각됨. 즉, 두유량 대비 0.5% 의 브로콜리 분말 첨가는 두부의 수득률에는 영향을 미치지 않은 것으로 판단됨.
- DBP-N150과 DBP-N63을 첨가한 두부는 대조군 두부와 비교했을 때 수분함량과 고형분 함량에서 큰 차이를 보이지 않았음. 반면 초미세 브로콜리 분말인 DBP-JM을 첨가한 두부는 다른 두부들에 비해 수분 함량이 낮고 고형분 함량이 높은 결과가 나왔음.

Table 78. 건조 브로콜리 파우더를 첨가한 두부의 수득률(%)

| Samples | 수득율 (%) |
|-----------|---------|
| Control | 48.8% |
| TDBP-N150 | 48.8% |
| TDBP-N63 | 48.8% |
| TDBP-JM | 48.7% |

Table 79. 건조 브로콜리 파우더를 첨가한 두부의 수분 함량, 고형분 함량 측정 결과

| Samples | 수분함량 (%) | 고형분 함량 (%) |
|-----------|-------------------------|-------------------------|
| Control | 82.25±1.74 ^a | 17.75±1.74 ^b |
| TDBP-N150 | 82.07±0.04 ^a | 17.93±0.04 ^b |
| TDBP-N63 | 82.34±0.08 ^a | 17.66±0.08 ^b |
| TDBP-JM | 79.11±1.41 ^b | 20.89±1.41 ^a |

Values are expressed as the mean ± standard deviation. No significant difference was observed between means (within the same property) designated by the same letter (Duncan's, $p < 0.05$).

- 브로콜리 분말을 첨가한 두부는 대조군에 비해 외관에서 보다 노란빛을 띄었음. TDBP-N150과 TDBP-N63 을 첨가한 두부는 표면에 팽창된 브로콜리 분말을 발견할

수 있었지만 초미세화 브로콜리 분말인 TDBP-JM 이 첨가된 두부는 대조군 두부와 외관이 유사함을 확인하였음.

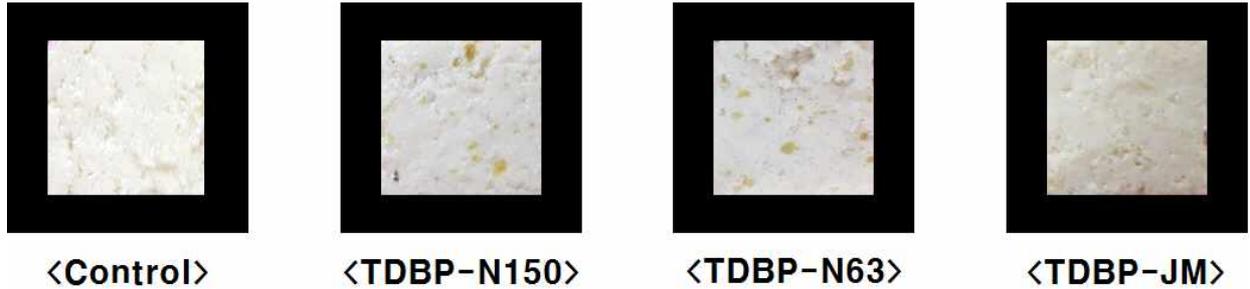


Fig 188. 브로콜리를 첨가한 두부의 외관

- 브로콜리 분말을 첨가한 두부에 대한 관능검사를 개별 인터뷰 방식으로 수행하였음. 대조군과 비교하였을 때 브로콜리 파우더를 첨가한 두부가 더 단맛을 내며 첨가된 입자의 크기가 작아질수록 단맛이 강했음. 이는 브로콜리 파우더의 관능평가 결과와 유사했음.
- 초미세 브로콜리 분말을 첨가한 TDBP-JM 이 다른 두부들에 비해 더 단단한 식감을 나타냈음.
- 관능검사 참가자들은 두부에 브로콜리 분말을 첨가했을 때 냄새, 질감, 맛에 대한 선호도를 증가시켜 전체적으로 맛에 대한 기호도를 상승시킨다고 기술했음. 제조된 두부의 질감과 맛을 고려할 때 샘플 DBP-JM의 첨가가 가장 적당할 것으로 판단되었음.

Table 80. 브로콜리를 첨가한 두부의 관능평가 결과

| Samples | 외형 | 관능적 특성 |
|-----------|--------|------------------|
| TDBP-N150 | 부드러움 | 보통 두부보다 약간의 단맛 |
| TDBP-N63 | 부드러움 | 보통 두부보다 약간의 단맛 |
| TDBP-JM | 유난히 단단 | 보통 두부와 달리 단맛이 강함 |

나. 브로콜리 분말을 첨가한 스펀지케이크의 제조와 특성

(1) 브로콜리 분말이 첨가된 스펀지케이크의 제조

- 브로콜리 파우더를 첨가하여 만든 스펀지케이크의 부피와 물성 변화를 연구하기 위해 스펀지 케이크를 제조하였음. 믹싱볼에 표준체(300 μm)로 친 박력분 125 g을 칭량함. 브로콜리 분말을 첨가할 경우 박력분 양의 10%를 브로콜리 분말로 대체하였음.
- 계란 240 g을 다른 믹싱볼에 넣고 거품기를 이용하여 약 1분간 풀어줌. 계란액에 설탕 150 g, 소금 1 g을 녹이면서 나누어 넣고 저속으로 설탕을 완전히 용해함. 설탕이 완전히 용해되면 고속으로 믹싱하여 10분간 거품을 냄. 여기에 준비한 박력분(혹은 박력분과 브로콜리 분말의 혼합물)을 넣고 주걱으로 가볍게 섞음. 버터를 전자렌지에 돌려 녹인 뒤 반죽에 나누어 넣고 바닥에 가라앉지 않도록 빠르게 골고루 섞음. 그 후 사각팬(255*105*85 mm)에 유산지를 깔고 반죽을 넣음. 팬을 작업대에 가볍게 내리쳐 큰 기포를 제거하면서 윗면을 평평하게 고름. 이후 윗불 180℃, 밑불 160℃의 오븐에서 25분간 구운 후 식혀 제품을 완성함.
- DBP-N150, DBP-N63, DBP-JM을 첨가하여 제조한 케이크를 각각 CDBP-N150, CDBP-N63, CDBP-JM이라고 명명하였음.



Fig 189. 건조 브로콜리 파우더를 첨가한 스펀지 케이크의 제조 과정

(2) 브로콜리 분말이 첨가된 스펀지케이크의 물성, 관능적 특성 측정방법

- 완성된 스펀지케이크를 일정한 두께로 자른 후 Cork borer를 사용하여 지름, 높이를 각각 1.9 cm 가 되도록 원통형으로 성형함. 준비된 시료의 물성은 Texture Analyzer (TAHDi/500, U.K.)를 이용하여 측정하였음. 측정 조건은 아래와 같음(Table 11).
- 브로콜리 분말을 첨가한 케이크의 외관 평가를 위해 제조된 스펀지케이크를 일정한 두께(1.9 cm)로 잘른 후 표면을 관찰하였음. 대조군인 일반 스펀지케이크로 평가의 기준을 제시하고 평가 결과는 패널들이 느낀 특성 중 공통적인 부분을 서술하였음.

Table 81. Texture analyzer 측정조건

| Option | TPA |
|-----------------|----------------|
| Pre-test speed | 2.0mm/sec |
| Test speed | 1.0mm/sec |
| Post-test speed | 1.0mm/sec |
| Strain | 75% |
| Probe Type | P20 (지름 2.0cm) |

(3) 브로콜리 분말이 첨가된 스펀지케이크의 물성과 관능적 특성

- 브로콜리 분말을 첨가한 스펀지케이크의 물성측정 결과, 대조군에 비해 입자가 큰 브로콜리 분말을 첨가한 스펀지케이크의 경도(Hardness)가 눈에 띄게 상승했음. 하지만 초미세 브로콜리 분말을 첨가한 스펀지케이크의 경도는 대조군과 비슷한 수준을 유지했음.
- 부착성(Adhesiveness)은 혀와 입천장으로 인지 할 수 있는 식품의 특성으로 샘플들 간 유의적 차이를 보이지 않았음.
- 탄성(Springiness)과 응집성(cohesiveness)의 경우, 브로콜리 분말 첨가에 따라 특성의 변화를 관찰할 수 있었지만 값의 변화가 매우 적은 수준으로 유의성은 낮은 것으로 판단되었음.
- 혀에 의해 인지되는 반고체 물질의 텍스처 특성인 검성(Gumminess)은 브로콜리 분말

의 추가에 의해 급격히 증가하지만 분말 입도가 감소함에 따라 감소하는 결과를 보여 주었음. 따라서 입도가 가장 큰 브로콜리 분말인 CDBP-N150을 첨가할 경우 검성값은 1605 까지 증가하지만 초미세 브로콜리 분말인 CDBP-JM을 첨가할 경우 검성값은 805 로 50% 가까이 낮아졌음.

- 다른 케이크들에 비해 jet mill 공정을 거친 브로콜리 파우더를 첨가한 케이크의 씹힘성 (Chewiness)가 눈에 띄게 감소했음. 이는 케이크의 경도 측정 결과와 비교했을 때 바람직한 결과임. 스펀지케이크의 복원성(Resilience)은 CDBP-N150과 CDBP-N63이 낮은 값을 나타냈고 CDBP-JM은 약간 상승했으나 control보다는 낮았다. 이는 탄력성과 관련이 있는 것으로 보여짐.

Table 82. 건조 브로콜리 분말을 첨가한 스펀지케이크의 물성 변화

| Samples | Hardness | Adhesiveness | Springiness | Cohesiveness | Gumminess | Chewiness | Resilie |
|-----------|------------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------|
| Control | 1727.16±543.17 ^b | -1.33±0.83 ^a | 0.86±0.03 ^a | 0.69±0.08 ^a | 1180.25±338.70 ^b | 1011.47 ±274.64 ^b | 0.28±0 |
| CDBP-N150 | 3660.14±1329.24 ^a | -1.54±1.89 ^a | 0.78±0.04 ^b | 0.46±0.09 ^c | 1605.50±359.26 ^a | 1249.28±238.01 ^a | 0.18±0 |
| CDBP-N63 | 4369.11±492.78 ^a | -1.49±1.64 ^a | 0.74±0.03 ^c | 0.41±0.04 ^c | 1774.65 ±48.95 ^a | 1313.54±46.65 ^a | 0.16±0 |
| CDBP-JM | 1346.83±760.71 ^b | -1.72±1.02 ^a | 0.86±0.03 ^a | 0.61±0.03 ^b | 804.61± 434.04 ^c | 683.90±357.14 ^c | 0.25 ±0 |

Values are expressed as the mean ± standard deviation. No significant difference was observed between means (within the same property) designated by the same letter (Duncan's, p

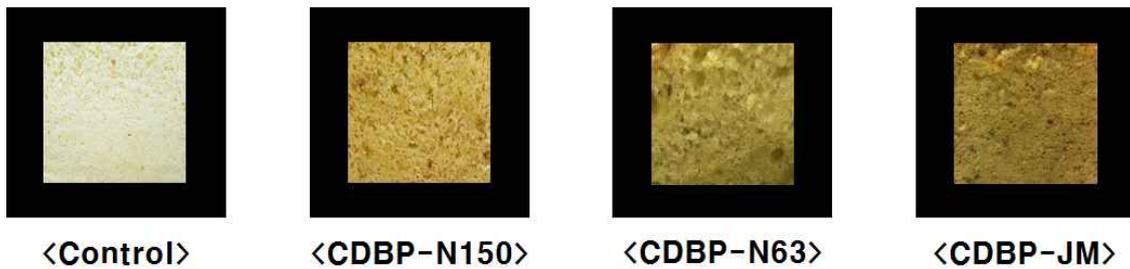


Fig 190. 브로콜리를 첨가한 스펀지케이크의 단면 사진

- 브로콜리 분말을 포함한 스펀지케이크는 대조군에 비해 어두운 초록색을 띄었고 입자의 크기에 따른 차이는 없었음. 패널들에게 외관이 가장 선호된 샘플은 대조군이었음.
- 브로콜리 분말을 첨가한 스펀지케이크는 브로콜리 향이 강하게 났으나 초미세 브로콜리 분말을 첨가한 CDBP-JM의 경우 비교적 향이 약했음. 브로콜리의 향이 강하게 나는 샘플은 패널들에게 부정적인 평가를 받았음.

- CDBP-N150과 CDBP-N63은 질감이 조금 더 단단하고 CDBP-JM은 비교적 부드럽다는 평을 받았음. 이는 스펀지케이크의 경도 측정 결과와 일치하였음.

Table 83. 브로콜리를 첨가한 스펀지케이크의 관능평가 결과

| Samples | 외형 | 관능적 특성 |
|-----------|---------|----------------------------|
| CDBP-N150 | 어두운 초록색 | 브로콜리 향이 강하게 남 |
| CDBP-N63 | 어두운 초록색 | 브로콜리 향이 강하게 남 |
| CDBP-JM | 어두운 초록색 | 브로콜리 향이 약하게 남, 비교적 부드러운 느낌 |

14. PEF 연속공정 적용 및 에너지 효율 분석

- PEF 연속처리 공정은 기존의 열처리에 비해 에너지 효율성이 높은 공정이다. 본 연구과제에서는 전과정평가(Life Cycle Analysis)를 통해 PEF 처리의 에너지 효율성을 확인하고자 하였음.
- 전과정 해석은 전과정 목록 분석 혹은 전과정 영향평가 결과를 토대로 주요 이슈를 규명하고 환경성 개선을 위한 대안을 모색하는 단계로 결과의 신뢰성을 평가하고 다양한 시나리오 분석을 통해 개선방안을 마련하여 결론과 권고사항을 제시함.

가. 설포라판 증폭을 위한 브로콜리의 PEF 전처리에 따른 에너지 효율 분석

(1) 전과정평가(Life Cycle Analysis) 기법을 이용한 브로콜리 전처리 공정선택 및 평가방법

- 전과정평가(LCA)란 제품의 전과정, 즉 원료 채취 및 가공, 제조, 수송, 유통, 사용 및 폐기 단계에 투입 및 배출되는 물질과 에너지를 정량화하여 이들이 환경에 미치는 영향을 총체적으로 평가하고 이를 바탕으로 환경 개선의 방안을 모색하고자 하는 객관적인 환경 영향평가 방법임(염선민, 2011).
- 전 과정평가 순서는 제 1단계: 목적 및 범위의 설정, 제 2단계: 목록분석, 제 3단계: 영향평가, 제 4단계: 해석의 순서로 수행된됨(ISO 14044, 2006).
- 전과정평가의 제 1 단계는 목적 및 범위 정의이며 이 단계에서는 연구를 수행하는 목

적과 대상 및 연구 적용 분야에 대해서 정의함. 또한 연구의 목적에 따라 대상제품 및 시스템의 기능을 정량화시킨 기능단위를 정의하고 시스템 경계를 설정함(표 14).

- 전과정평가의 제 2 단계는 목록분석 단계임. 이 단계에서는 연구의 범위 설정에서 정의한 시스템 경계와 기준들에 의거하여 제품의 시스템에 투입(input)되는 자원과 에너지 및 생산 또는 배출(output)되는 제품·부산물, 그리고 오염물을 정의하고 데이터를 수집하는 단계이임(표 15).

Table 84. 목적 및 범위 설정 필요 요건

| 구분 | 필요 요건 사항 |
|------------|--|
| 전과정 평가의 목적 | <ul style="list-style-type: none"> ● 전과정 평가 실시 이유 ● 보고 대상자 ● 전과정평가 결과의 응용 |
| 전과정 평가의 범위 | <ul style="list-style-type: none"> ● 전과정평가 대상이 되는 제품이나 시스템의 명확한 정의 ● 제품명, 기능 및 기능단위(FU, Functional Unit), 경계(System boundary)등 ● 필요한 데이터의 범위와 질 (Data Quality) ● 전제조건, 제약사항 ● 고려할 환경영향평가항목의 설정과 그 평가 방법 ● 할당(Allocation) 방법 ● 제품과 부산물 또는 재활용에 대한 환경부하의 배분방법 등 |

Table 85. 시스템 경계에 따른 분류

| 구분 | 필요 요건 사항 |
|------------------|--|
| Cradle-to-Grave | ● "요람에서 무덤까지"는 제조에서 사용단계를 거쳐 폐기단계에 이르기까지 모든 단계에 대한 전과정평가를 이르는 말이다. |
| Gradle-to-Gate | ● "요람에서 문까지"는 생산품의 부분적인 전과정평가 방법으로 제조단계에서 소비자에게 전달되기 이전까지의 과정을 평가하며 사용과 폐기단계는 생략된다. |
| Gradle-to-Gradle | ● "요람에서 요람까지"는 "요람에서 무덤까지"의 특정 종류의 한 부분으로 생산품의 최종 처리단계에서 새로운 제품이 생산되는 재활용이 이루어지는 경우에 해당한다. |
| Gate-to-Gate | ● "문에서 문까지"는 일련의 전체 생산단계에서 단 하나의 부가가치 공정에 집중하여 부분적으로 전과정평가를 실시하는 것을 일컫는다. |

- 전과정평가의 제 3단계는 영향평가 단계이다. 영향평가는 목록분석에서 얻어진 데이터를 근거로 각 환경부하항목에 대한 목록결과를 각 환경영향 범주로 분류하여 환경영향을 분석, 평가하는 단계임.

- 영향평가를 위해 첫 번째로 수행하는 것은 특성화(Characterization impact)다. 이 단계에서는 영향에 대한 잠재성들이 계산됨. 다음 단계는 정규화와 가중화이다. 정규화는 환경영향범주의 다양한 타입을 비교할 수 있는 기준을 제공함. 가중화는 할당된 가중화

계수를 각각의 영향 범주에 곱하여 계산됨. 때로는 각 범주의 환경영향을 종합하여 전체로서 환경에 주는 영향을 분석, 평가함.

- 설포라판 증폭을 위한 브로콜리의 전처리 기술은 PEF 적용을 통해서만 이루어지므로 기존 열처리 공정과의 직접적인 비교는 불가능함. 하지만 일반적인 가열 Blanching 과 비교하기 위해 열수를 이용한 가열 Blanching 공정에서 필요한 물질과 에너지의 투입량을 산출하였음.
- 열수를 이용하여 95°C 까지 가열하고 1분간 유지 한 후 냉각수(지하수)를 이용하여 냉각하는 공정임. 이때 사용되는 에너지는 브로콜리의 가열에 필요한 열 에너지임. 브로콜리의 Specific heat는 $3.86 \text{ kJ}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{°C}^{-1}$ 이므로 브로콜리 1 kg을 95°C 까지 가열하는데 필요한 에너지는 289.6 kJ 로 계산되며 일반적인 가열장치의 열효율을 80% 수준이라 할 때 362 kJ 의 에너지가 소요됨.

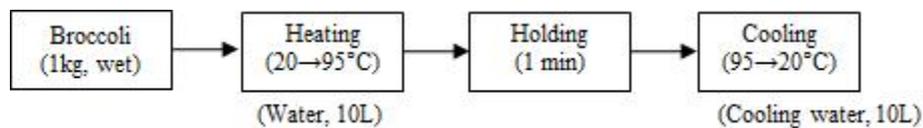


Fig 191. 브로콜리의 열수 Blanching 공정 흐름도

- 상온(20°C)에서 저장 중인 브로콜리 1 kg을 PEF를 이용하여 처리하는 공정의 흐름도는 아래와 같음. PEF 처리는 2 kV/cm 의 전기장세기로 이루어 졌으며 펄스의 폭은 30μs 로 고정되었다. 브로콜리에 가해지는 펄스의 횟수는 500회, 1000회, 1500회 등으로 조정되며 펄스폭 30μs를 고려하여 계산하면 처리시간은 각각 0.015 s, 0.030s, 0.045 s 에 해당함.

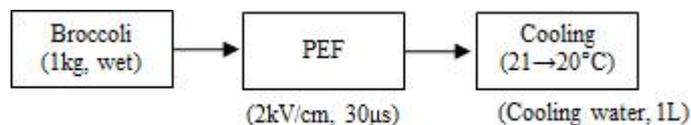


Fig 192. 브로콜리의 PEF 처리 공정 흐름도

- 측정결과 500회 펄스처리에는 약 15 kJ/kg 의 에너지가 소비되는데 그쳤음. 이는 95°C 에서 가열 Balnching 하는데 비해 5% 에 불과한 수준임.

제 4 절 <제3세부기관(협동) : 경기대학교 산학협력단> PEF처리 십자화과 식물들의 면역 및 항암활성 비교 평가

1. 재료 및 방법

가. 재료

(1) 실험 재료

- 예비 실험에 사용된 십자화과 식물은 제주도에서 재배된 브로콜리, 적양배추, 무, 방울다다기 양배추를 BK bio(제주, 대한민국)측에서 제공받아 이용하였으며, 본 실험의 주재료인 브로콜리는 동일 재배지로부터 구입하여, 가식부 부분만을 사용하였음.

(2) 시약 및 실험동물

- 본 연구에서 다당의 효소처리에 사용된 Plantase MAX (from *Aspergillus niger*)는 비전바이오캠 (Seongnam, Korea)에서 구입하였으며, dialysis tubing (MW cut-off 12,000-14,000)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하였음. 다당의 정제에 사용된 Sephadex G-75와 Superdex 75 GL column은 GE healthcare (Uppsala, Sweden)사로부터 구입하였음. 분자량 측정에 사용된 표준물질 Pullulan series (P-800, 100, 50, 20, 10 및 5)는 Showa Denko (Tokyo, Japan)사로부터 구입하여 사용하였음.
- Cytotoxicity와 macrophage 활성 측정 실험에 사용된 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin은 Welgene (Daegu, Korea)사에서 구입하여 사용하였고, EZ-cytox는 Daeil lab service (Seoul, Korea)사에서 구입하여 사용하였음. 면역활성 대조군으로 사용된 lipopolysaccharide from *E-coli* O127:B8 (LPS)는 Sigma사의 제품을 사용하였고, PSK (Polysaccharide-K from *Coriolus versicolor*)는 한국 광동제약(Seoul, Korea)에서 시판하는 코포랑[®]으로부터 가용 획분을 정제하여 사용하였음. 한편, 항보체 활성에서 사용된 양의 감작적 혈구(IgM-hemolysis sensitized sheep erythrocyte, EA cell)는 일본의 Biotest (Tokyo, Japan)사 제품을 사용하였음. 그 외 본 실험에서 사용된 모든 시약은 시판 1급 이상의 분석용 제품이 사용되었음.
- 또한 본 실험에 사용된 실험동물 inbred mice BALB/c mouse (5-6 weeks, ♀)는 새론바이오(Uiwang, Korea)에서 구입하여 일주일간 적응을 거친 후 실험에 사용하였음. 사육 조건은 23±3℃, 습도 55~70%, 물과 사료는 자유 급식 형태로 유지하였음. 인공조명 아래 1일 12시간씩(오전 9시-오후 9시) 명암 교대 하였으며 경기대학교 동물윤리위원회의 허가(2015-001, 2016-004 및 2017-004)를 거쳐 규정에 따라 진행하였음.

(3) 완충용액

- 항보체 활성 측정에 사용한 GVB⁺⁺ (gelatin-veronal buffered saline, pH 7.4)는 Kabat 등의 방법에 따라 Ca⁺⁺과 Mg⁺⁺ (500 mM 및 2 mM)이 함유되도록 조제하였음. PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.2)는 Amresco사(Solon, OH, USA)에서 tablet 형태로 구입하여 제조사 지침에 의거하여 제조하였음.

나. 실험 방법

(1) 십자화과 식물 유래 생리활성 물질의 추출 및 분리

(가) 십자화과 식물들(브로콜리, 적양배추, 방울양배추, 무)의 시료 조제

- 본 연구에서는 PEF 처리 십자화과 식물에 존재할 것으로 기대되는 면역 및 항암활성에 대해 *in vitro* 상에서 비교, 평가하여 고부가 가치 십자화과 식물 소재의 생산을 위한 기초자료를 얻기 위해 수행되었음.
- 십자화과 식물인 브로콜리(Broccoli), 적양배추(Red cabbage), 방울양배추(Brussels sprout), 무(Radish)의 원재료와 이들을 PEF 처리한 시료를 대상으로 *in vitro* 상에서 고면역활성이 발현된 시료를 선별하기 위해 먼저 알콜 추출법, 단순 열수 추출법과 다당 추출법을 이용하여 시료를 조제하기로 함(Fig. 1).
- ▶ PEF 처리하지 않은 군(C), PEF 처리 강도에 따른 PEF-1(P1)과 PEF-2(P2) 시료로 알콜 추출을 행함. 알콜 추출은 원재료에 2배 부피의 증류수를 가하여 반응시킨 후, 8배 부피의 95% ethanol을 가하여 추출한 후 농축, 건조를 행하여 시료를 분리하였음. [브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)]을 조제하였음.
- 단순 열수 추출은 알콜 추출 후 남은 잔사에 10배 부피의 증류수를 가하여 100 °C에서 3시간 동안 추출하고 원심분리하여 상등액을 회수하여 동결건조 하였음. [브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울 양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]를 조제하였음.
- 다당 추출은 단순 열수 추출 일부를 이용하여 4배 부피의 95% ethanol을 가하여 다당을 침전시킨 후, 침전물에 다시 DW:Ethanol=1:3의 ethanol solution을 가하여 저분자 획분을 제거하고 조다당 4 종을 분리하였음. [브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울 양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]을 조제하였음.

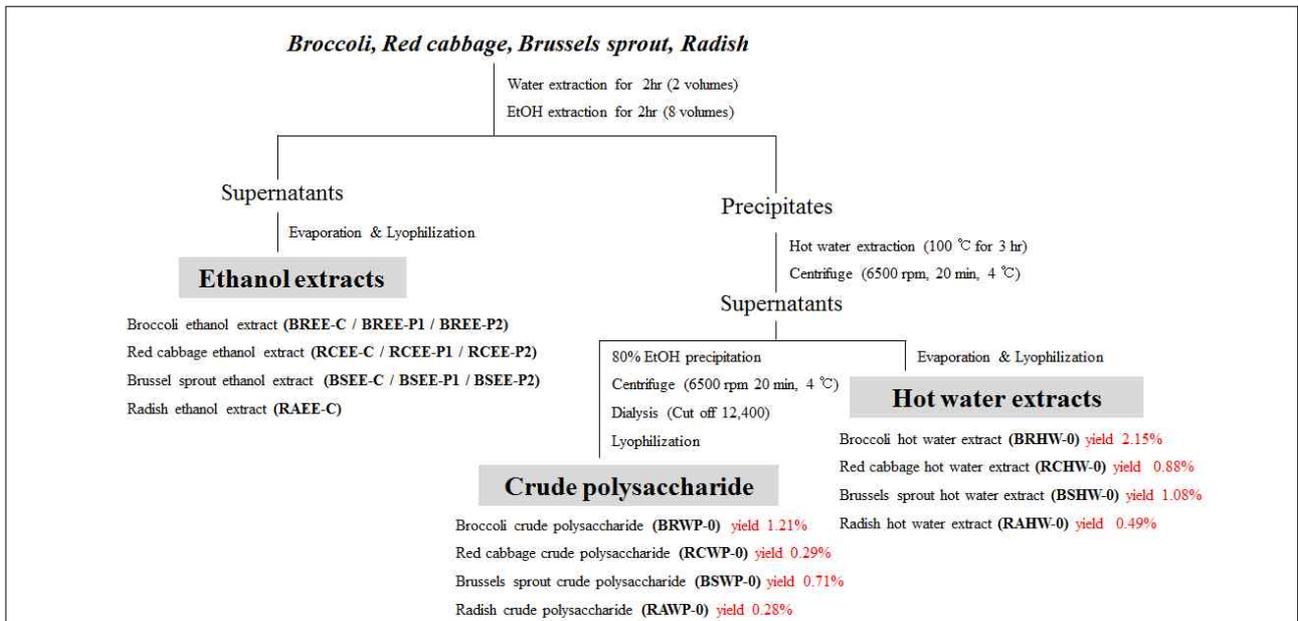


Fig 193. Isolation of ethanol extracts, hot water extracts and crude polysaccharides from broccoli, red cabbage, radish and brussels sprout.

(나) 브로콜리 유래 다당의 분리 및 정제

① 브로콜리 유래 다당의 분리

○ PEF 처리 후 남은 브로콜리 잔사 1 kg에 20 L의 DIW를 넣은 뒤, pH 4.1로 조정하였으며, 시판 상업용 pectinase 효소인 Plantase MAXTM(비전바이오캡)를 건조 잔사 대비 1%를 첨가하여 50°C에서 균질화시키며 2일간 가수분해하였음. 그 후, 면포를 이용하여 잔사를 거른 뒤, 상등액을 회수하고, 상등액의 4배에 해당하는 EtOH를 넣은 뒤, 24시간 동안 당 침전을 하였으며, 그 후 원심분리(6500 rpm, 30 min, 4°C)하여 침전물을 분리하였음. 침전물은 소량의 DIW에 재용해한 다음 dialysis tubing (MW cut off 12,000-14,000; Sigma)을 이용하여 2일간 투석을 진행하였음. 이후 동결건조하여 브로콜리 유래 효소처리 조다당(BCE-0)을 얻었음(Fig, 2).

② 브로콜리 유래 다당의 정제

○ 브로콜리 유래 효소처리 조다당을 소량의 물에 용해 한 후(200-400 mg/6 mL), 50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5)로 평형화된 Sephadex G-75 column (2.5 × 90 cm)에 loading하여, gel permeation chromatography (GPC)를 행하였음. 용출액은 6 mL씩 100개의 획분으로 분획하였으며, 중성당, 산성당 및 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo)-liked materials 함량 분석실험을 거쳐 서로 다른 3개의 획분(BCE-I, BCE-II 및 BCE-III)을 얻을 수 있었음 (Fig. 2).

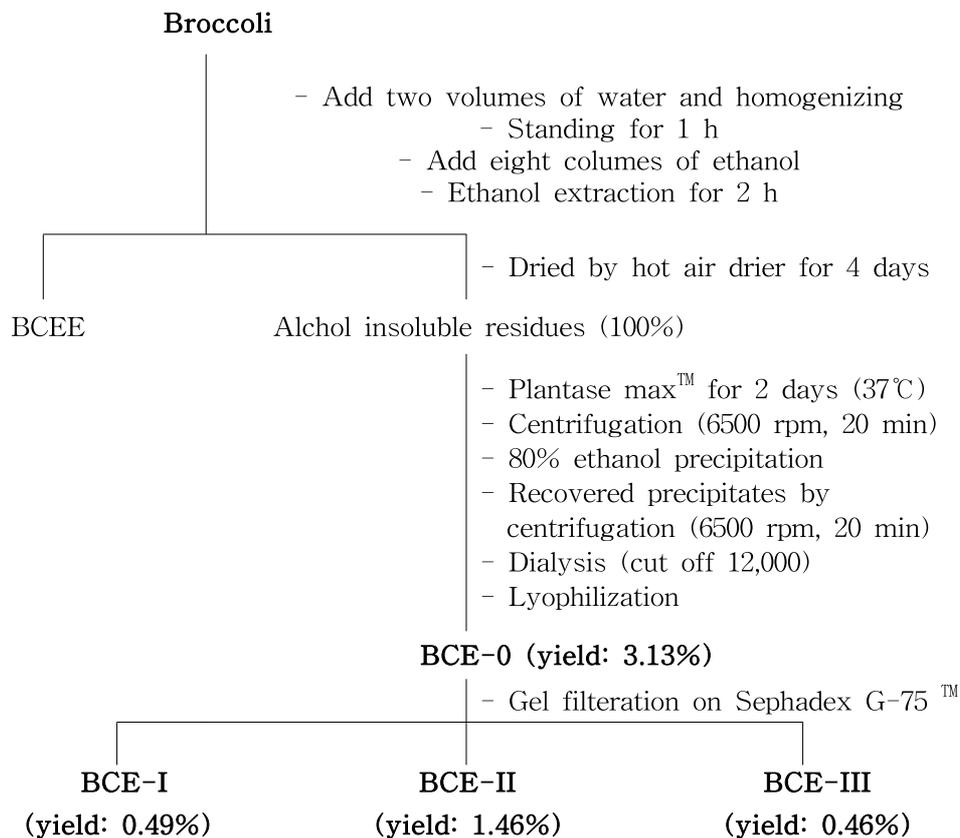


Fig 194. Isolation and purification of immunostimulating polysaccharides from broccoli.

(2) 시료에 의한 면역활성 및 항전이 활성능 측정

(가) Human 및 mouse 유래 종양 세포주에 대한 성장 저해능 측정

- 십자화과 유래 에탄올 추출물, 단순 열수추출물 및 조다당 시료에 대하여 종양 세포주에 직접적으로 성장저해를 나타내는지 확인하고자, human 유래 종양세포주로서 대장암 유래의 SW-620 세포주와 HT-29 세포주, 폐암 유래의 A549 세포주와 NCI-H460 세포주를 이용하였고, mouse 유래 종양세포는 대장암 유래의 Colon26-M3.1 세포주와 흑색종 유래의 B16-BL6, 그리고 정상세포주인 복강유래 대식세포를 이용하였음. 이들 종양 세포주를 각각 1×10^5 cells/mL의 농도로 계수한 후 flat-bottomed 96-well microplate에 100 μ L씩 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2일간 배양하였고, 복강 유래 macrophage는 2.5×10^6 cells/mL의 농도로 계수한 후 flat-bottomed 96-well microplate에 100 μ L씩 분주하였음. 그 후, 모든 세포에 대하여 1,000 μ g/mL농도의 십자화과 유래 에탄올 추출물, 단순 열수추출물 및 조다당 시료를 각 well에 100 μ L씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하여 측정하였음. 시료의 세포 독성 효과는 상등액을 제거한 뒤, EZ-cytox (Daeil lab service)를 PBS에 10배 희석하여

well 당 200 μ L씩 가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 반응시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였음.

(나) Cytokine 생산 활성 측정

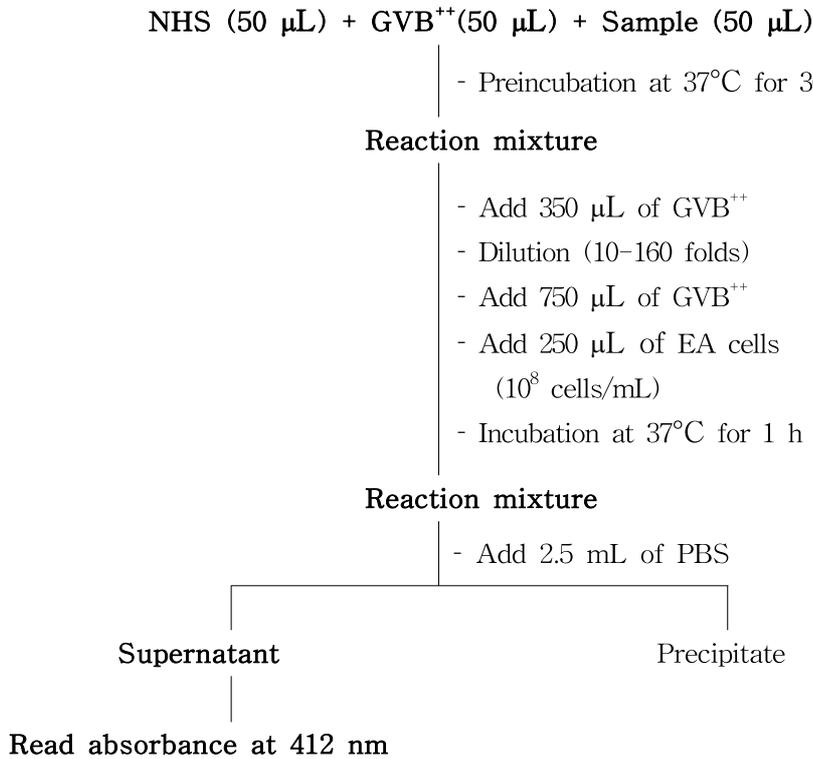
- BALB/c (우, 6 weeks) mouse의 복강에 5% thioglycollate medium (TG) 1 mL를 주입하고 72시간 동안 유도하여 회수된 macrophage (2.5×10^6 cells/mL of DMEM) 100 μ L를 가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양하였음. 여기에 다양한 농도로 회수된 시료를 flat-bottomed 96-well microplate에 100 μ L씩 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였음. 배양 종료 후 900 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하여 세포배양액 150 μ L를 회수하고 상등액 중에 유도된 cytokine의 함량을 측정하였음.
- Macrophage에 의해 생산된 cytokine의 함량은 sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)에 의해 분석하였다. 각 cytokine은 interleukin (IL)-6, IL-12 kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) 및 tumor necrosis factor (TNF)- α kit (eBioscience, San Diego, CA, USA)을 이용하였음. Coating buffer에 희석하여 immuno 96-well microplate에 coating한 후 4°C에서 12시간 방치하였음. Coating이 완료된 microplate는 washing buffer (PBS with 0.05% tween 20, PBST)를 이용하여 3차례 세척하고, assay diluent (PBS with 2% skim milk or Diluent buffer) 200 μ L을 분주한 뒤, 1시간 동안 방치하여 항체가 붙지 않은 well 표면을 blocking하였다. Blocking 완료 후 각 well은 washing buffer를 이용하여 재차 3회 세척하고, 각 well에 연속 희석한 표준물질(recombinant mouse cytokine)과 면역세포 배양액을 각각 50 μ L씩 분주하였음. 이를 실온에서 2시간 동안 방치한 다음 washing buffer로 세척하고 detection antibody (in assay diluent) 50 μ L를 처리하여 실온에서 1시간 방치한 후 재차 세척하였음. Enzyme reagent (avidin-horseradish peroxidase conjugate) 50 μ L를 처리하여 실온에서 30분간 결합시킨 후 substrate solution [tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide] 50 μ L를 가하여 암소에서 30분간 반응시킨 후 50 μ L의 stop solution (2 N H₂SO₄)을 처리하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였음.

(다) 항보체 활성 측정

- 건강한 성인의 혈액을 채취하여 실온에서 약 15분간 방치하여 응고시킨 후, 응고된 혈액을 절단하고 원심분리(2,000 rpm, 15 min, 4°C)하여 혈청을 분리한 뒤 미량 원심분리용 튜브에 1 mL씩 분주하여 -70°C에서 냉동 보관하면서 실험에 사용하였음.
- 항보체 활성은 Meyer법을 이용하여 시료에 의한 보체 소비(complement consumption) 후 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈 정도에 근거를 둔 complement fixation test 방법으로 측정하였음. 여러 농도로 증류수에 용해시킨 시료를 GVB⁺⁺ (gelatin veronal buffer, pH 7.4, 0.1% gelatin, 0.15 mM Ca⁺⁺, 0.5 mM Mg⁺⁺ 함유) 및 정상인의 혈청과

각각 50 μL 씩 혼합하여 37°C에서 30분간 1차 반응시켰음. 동 반응액에 GVB^{++} 350 μL 를 가하고, 이를 10-160배까지 연속 희석시킨 후, 750 μL 의 GVB^{++} 와 양의 감작적혈구 (IgM-sensitized sheep erythrocyte, EA cell, 1×10^8 cells/mL)를 250 μL 를 가하여 37°C에서 60분간 2차 반응시키고, PBS (pH 7.4) 2.5 mL를 가하여 반응을 정지시켰음. 반응액은 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하였으며, 얻어진 상등액을 412 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 용혈활성을 측정하고 Fig. 3의 Eq. 1을 통하여 계산하였음.

- 항보체 활성은 정상인의 혈청과 GVB^{++} , 증류수만을 반응시킨 음성대조군의 총 보체용혈(50% total complement hemolysis, TCH_{50} , %)에 대한 저지율(inhibition of 50% total complement hemolysis, ITCH_{50} , %)로써 나타내었음. 양성대조군으로는 운지버섯 유래 면역증강제인 polysaccharide K(PSK)를 사용하여 비교하였음 (Fig. 3).



$$\text{ITCH}_{50}(\%) = \frac{\text{TCH}_{50} \text{ of control} - \text{TCH}_{50} \text{ of sample}}{\text{TCH}_{50} \text{ of control}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Fig 195. Assay procedures for anti-complement activity.

(라) 림프구 활성 측정

○ BALB/c (♀, 6 weeks) mouse를 경구탈골법으로 치사시킨 후 무균적으로 비장 (spleen)을 적출하여 stainless steel mesh를 이용, PBS 상에서 마쇄(100 mesh) 및 여과(200 mesh)하여 비장세포를 획득하였음. 0.2% NaCl 2 mL을 1분 동안 가하여 혼입된 적혈구를 파괴하고, hemacytometer를 이용하여 세포수를 6×10⁶ cells/mL이 되도록 조정하였음. 분리된 비장세포 100 μ L와 RPMI 1640에 용해한 시료 100 μ L를 flat-bottomed 96-well microplate에 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 동안 배양하였음. 배양 종료 후 900 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리 하여 세포배양액 150 μ L를 회수하고, 독성을 측정하기 위해서 PBS 50 μ L를 채운 뒤, EZ-cytox (Daeil lab service)를 PBS에 5배 희석하여 well 당 100 μ L씩 가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 180분간 반응시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 회수한 상등액은 IL-4, IFN- γ 및 TNF- α 를 측정하기 위해 sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

방법에 의해 IL-4, interferon (IFN)- γ kit (BD Bioscience) 및 TNF- α kit (eBioscience)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였음.

(마) 정맥투여를 통한 시료의 면역 활성화와 항전이 효과

① 자연 살해 세포 (NK cell)에 의한 종양세포 살해능

○ 브로콜리 유래 효소처리 조다당 및 정제 다당 시료를 BALB/c (6 weeks, ♀) mouse에 농도별로 실험진행 3일전, 1일전에 농도별로 정맥투여를 진행하였고, 그 후 경추탈골 법으로 치사시켜 무균적으로 비장(spleen)을 적출하였음. Stainless steel mesh를 이용, PBS 상에서 마쇄(100 mesh) 및 여과(200 mesh)하여 비장세포를 획득하였음. 0.2% NaCl 2 mL을 1분간 가하여 혼입된 적혈구를 파괴하고, 세포수가 1×10^7 cells/mL, 5.0×10^6 cells/mL 그리고 2.5×10^6 cells/mL이 되도록 조정하고 이를 effector cell로 사용하였음. Natural killer (NK) cell에 대한 감수성이 높은 종양세포 YAC-1을 target cell로 하여 1×10^5 cells/mL이 되도록 조정한 뒤 round-bottomed 96-well microplate에 최종적으로 effector cell과 target cell의 비율(E/T ratio)을 100, 50, 25:1이 되도록 조정하였음. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6시간 배양 후 effect cell의 살해능에 의해 target cell로부터 유리되는 lactate dehydrogenase (LDH)의 발생량을 EZ-LDH (Daeil lab service)을 사용하여 측정하였으며, cytokine을 측정하기 위해 24 시간동안 5% CO₂ 배양기에서 배양하였음. Ggranzyme 생산량은 granzyme B kit (eBioscience)로, IFN- γ 생산량은 ELISA kit (BD Bioscience)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 실험을 진행하였음. 결과는 다음 식을 이용하여 계산하였음(Eq. 2).

NK cell activity(%)

$$= [(\text{experimental-effector spontaneous})/(\text{target maximum-target spontaneous})] \times 100$$

(Eq. 2)

② 정맥투여를 통한 종양세포에 대한 항전이 활성화 (Anti-metastatic activity)

○ 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0와 정제다당 BCE-I 시료에 대한 항전이 활성화는 폐(lung)에 대한 고전이성 종양세포주인 Colon26-M3.1 cell을 이용한 실험동물 종양전이 모델을 이용하였음. 시료에 의한 종양전이 효과를 관찰하기 위해 시료는 종양세포주를 주입하기 3일, 1일전에 각 농도별(100, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$)로 정맥투여하였고, 이후 Colon26-M3.1 cell (3×10^4 cells/mouse)를 BALB/c mouse의 정맥을 통하여 접종하였음. 종양 접종 14일 뒤 mouse를 치사시키고, 종양세포의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's solution (Sigma)에서 전이된 종양을 고정시킨 후, 전이된 종양의 colony를 계수하였음. 시료에 의한 항전이 효과는 종양만을 접종한 대조군과 비교하여 산출하였음.

③ NK cell 기능이 제어된 mouse에서의 항전이 활성화 (Anti-metastatic activity)

○ 항전이 활성화는 주로 NK cell의 활성화에 기인하여 작용하는 것으로 알려져 있어, 기존 폐(lung)에 대한 고전이성 종양세포주인 Colon26-M3.1 cell을 이용한 실험동물 종양전이 모델에 NK cell을 저해하는 rabbit anti-asialo GM1 항체를 정맥투여하여 실험을 진행하였음. 앞선 항전이 활성화가 우수한 BCE-I 다당 시료를 종양세포주 접종 3일, 1일전에 각 농도별(100, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$)로 정맥투여 하였음. 또한 rabbit anti-asialo GM1 antibody (Wako Pure Chemicals industries, Ltd., Japan)를 접종하기 2일전에 제조사의 매뉴얼에 의거 정맥에 주입하였음. 이후, Colon26-M3.1 cell (3×10^4 cells/mouse)을 BALB/c mouse 미정맥에 접종하였음. 종양접종 14일 뒤 mouse를 치사시키고, 종양세포의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's solution (Sigma)에서 전이된 종양을 고정시킨 후, 전이된 종양의 colony를 계수하였음.

④ 세포독성 T 림프구에 의한 종양세포 살해능 (CTL activity)

○ 브로콜리 유래 정제다당 BCE-I에 대한 cytotoxic T lymphocyte (CTL) 활성화는 폐(lung)에 대하여 고전이성 종양세포주인 Colon26-M3.1 cell을 이용한 실험동물 종양전이 모델에서, 비장세포를 회수하여 접종한 종양전이세포와 co-culture하였을 때, 적응면역세포의 일종인 CTL 활성능을 확인하였음. 시료에 의한 CTL의 효과를 관찰하기 위해 시료는 종양세포주를 주입하기 3일, 1일전에 1,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 으로 정맥투여하였음. 이후, Colon26-M3.1 cell (3×10^4 cells/mouse)를 BALB/c mouse의 정맥에 접종하였음. 종양접종 14일 뒤 mouse를 치사시키고, 그 후, 경추탈골 법으로 치사시켜 무균적으로 비장(spleen)을 적출하였음. Stainless steel mesh를 이용, PBS 상에서 마쇄(100 mesh) 및 여과(200 mesh)하여 비장세포를 획득하였음. 0.2% NaCl 2 mL을 1분간 가하여 혼입된 적혈구를 파괴하고, 세포수가 1×10^7 cells/mL, 5.0×10^6 cells/mL 그리고 2.5×10^6 cells/mL이 되도록 조정하고 이를 effector cell로 사용하였음. 적응면역을 확인하기 위해, 접종 했던 종양세포주인 Colon26-M3.1 cell을 target cell로 하여 1×10^5 cells/mL이 되도록 조정한 뒤 round-bottomed 96-well microplate에 최종적으로 effector cell과 target cell의 비율(E/T ratio)을 100, 50, 25:1이 되도록 조정하였음. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6시간 배양 후 effect cell의 살해능에 의해 target cell로부터 유리되는 LDH의 발생량을 EZ-LDH (Daeil lab service)을 사용하여 측정하였으며, CTL의 종양세포 살해능의 지표물질인 LDH는 다음 식에 의해 계산하였음 (Eq. 3).

Cytotoxic T lymphocyte activity(%)

$$= [(\text{experimental-effector spontaneous})/(\text{target maximum-target spontaneous})] \times 100$$

(Eq. 3)

(바) 경구투여를 통한 시료의 면역활성과 항전이 효과

① 경구투여를 통한 자연 살해 세포 (NK cell) 활성화

○ 브로콜리 유래 정제다당 BCE-I을 BALB/c (6 weeks, ♀) mouse에 농도 별로 20일간 격일로 투여한 후, 경추탈골법으로 치사시켜 무균적으로 비장(spleen)을 적출하였음. 그 후의 실험과정은 2.2.5.1. 자연 살해 세포 (NK cell)에 의한 종양세포 살해능의 방법과 동일하게 granzyme B ELISA kit (eBioscience)으로 확인하였음. NK cell의 종양세포에 대한 살해능은 eq.2 식에 의해 계산하였음.

② 경구투여를 통한 종양세포에 대한 항전이 활성 (Anti-metastatic activity)

○ 브로콜리 유래 정제다당 BCE-I에 대한 항전이 활성은 폐(lung)에 대한 고전이성 종양세포주인 Colon26-M3.1 cell을 이용한 실험동물 종양전이 모델을 이용하였음. 시료에 의한 종양전이 효과를 관찰하기 위해 시료를 각 농도별(100, 500, 1,000 µg/mouse)로 25일간 격일로 경구투여 하였음. Colon26-M3.1 cell (3×10^4 cells/mouse)을 BALB/c mouse의 정맥에 접종하였으며, 종양접종 14일 뒤 mouse를 치사시키고, 종양세포의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's solution (Sigma)에서 전이된 종양을 고정시킨 후, 전이된 종양의 colony를 계수하였음. 시료에 의한 항전이 효과는 종양만을 접종한 대조군과 비교하여 산출하였음.

(3) 시료의 대식세포 활성화에 대한 작용기작 규명

(가) Mitogen-activated protein (MAP) kinase와 NFκB pathway

① RAW 264.7 cell의 chemokine 및 cytokine 측정

○ RAW 264.7 cell을 회수하여 chemokine의 일종인 nitric oxide (NO)를 측정하기 위하여 3×10^6 cells/mL로 세포수 조절을, cytokine인 IL-6 및 TNF-α를 측정하기 위하여 1.5×10^6 cells/mL로 세포수 조절하여 flat-bottomed 96-well microplate에 100 µL을 분주하였음. 그 후 BCE-0을 DMEM에 2,000 µg/mL의 농도가 되도록 녹인 후, 15.6 µg/mL의 농도가 되도록 2배수로 연속 희석하여 각 농도를 세포가 분주된 각 well에 100 µL 첨가하였음. 세포와 시료가 들어간 microplate를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였으며, 배양 종료 후 900 rpm, 4°C에서 5분간 원심 분리하여 세포배양액을 회수하고 상등액 중에 유도된 chemokine 및 cytokine의 함량을 측정하였음.

② Western blot 시료의 준비

○ RAW 264.7 cell을 회수하여 2×10^6 cells/mL 로 조절한 후 6 cm dish에 3 mL을 가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 18시간 배양하였음. 여기에 DMEM에 10,000 µg/mL 농도로 조제한 BCE-0시료 용액을 이용하여 최종농도가 0, 50, 100, 200, 500 µg/mL, LPS는 1 µg/mL의 농도가 되도록 분주하며 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 배양하였음. 배양 종료 후 dish에 남아있는 배지를 제거한 뒤, TBS로 washing하고, 이후 PIC (protease inhibitor cocktail), DTT (dithiothreitol), Na₃VO₄ (sodium orthovanadate), β-Glycerol (β-glycerophosphate), PMSF (phenylmethane sulphonyl fluoride)이 함유된 RIPA buffer 400 µL를 처리하고 바로 ice상에 방치하였음. Scraper를 이용하여 dish의 바닥으로부터 세포를 회수하여, tube에 옮겨 ice에 60분간 방치한 후 혼합하였음. 단백질을 회수하기 위하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하였으며, 용출된 단백질을 정량하기 위하여 BCA assay kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)을 제조사 지침에 따라 단백질 양을 정량하였음. 동일한 단백질 양에 맞춰 sample buffer를 3:1비율로 혼합하고 5분간 100°C에서 중탕한 후, 상온에 보관하며 실험에 사용하였음.

③ Western blotting

○ 추출된 단백질을 10% polyacrylamide gel에 120 V에서 80분간 전기영동을 진행한 후, 완료된 gel은 PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA)에 100 V에서 70분간 transfer시켰음. 이 후 membrane을 5% skim milk 및 5% BSA를 이용하여 90-120분간 blocking 하고, TBS-T (Tris 247 mM, NaCl 1370 mM, KCl 27 mM, Tween20 0.5%, pH 7.6)를 이용하여 세척하였음. 1차 항체를 각각의 비율로 희석하여 처리하고, 4 °C에서 14시간동안 천천히 교반하였으며, TBS-T를 이용하여 세척하였음. 2차 항체를 각각의 비율로 희석하여 처리하고 90분간 배양한 후, TBS-T를 이용하여 세척하였다. 완료된 membrane은 Enhanced chemiluminescence (ECL; Daeil lab service)와 반응시켜 X-ray film으로 원하는 단백질의 발현량을 확인하였음.

(나) Inhibitor를 사용한 세부 기작 확인

① Inhibitor를 처리한 RAW 264.7 cell의 chemokine 및 cytokine 측정

○ RAW 264.7 cell을 회수하여 NO 측정을 위하여 3×10^6 cells/mL의 세포수 조절을, cytokine을 측정하기 위하여 1.5×10^6 cells/mL로 세포수 조절하여 flat-bottomed 96-well microplate에 100 µL을 분주하였음. 여기에 각각의 inhibitor (SB, PD, JNK II, BAY)를 처리하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후, DMEM에 10,000 µg/mL 농도로 조제한 다당 시료 용액을 최종농도가 500 µg/mL의 농도가 되도록 희석하였고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였음. 배양 종료 후 900 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하여 세포배양액을 회수하고 상등액 중에 유도된 cytokine의 함

량을 측정하였음.

② Western blot 시료의 준비 및 blotting

- RAW 264.7 cell을 회수하여 2×10^6 cells/mL로 조절 한 다음, 6 cm dish에 3 mL을 가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 18시간 배양하였음. 그 후, inhibitor를 각 농도에 맞게 분주한 뒤, 1시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 방치하였음. DMEM에 10,000 µg/mL 농도로 조제한 BCE-0시료 용액을 이용하여 최종농도가 500 µg/mL, LPS는 1 µg/mL의 농도가 되도록 분주하며 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 배양하였음. 배양 종료 후 dish에 남아있는 배지를 제거한 뒤, 2.3.1.2. Western blot 시료의 준비와 동일 방법으로 시료를 준비하였으며, 2.3.1.2. Western blotting과 동일한 방법으로 측정하였음.

(다) Anti-PRRs를 이용한 macrophage 수용체 확인

- RAW 264.7 cell을 회수하여 NO 측정을 위하여 3×10^6 cells/mL의 세포수 조절을, cytokine을 측정하기 위하여 1.5×10^6 cells/mL로 세포수 조절하여 flat-bottomed 96-well microplate에 100 µL을 분주하였음. 여기에 각각의 receptor blocking antibodies (TLR2, TLR4, Dectin1, CR3, CD14, SR, MR)를 처리하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후, DMEM에 10,000 µg/mL 농도로 조제한 다당 시료 용액을 최종농도가 500 µg/mL의 농도가 되도록 희석하였고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였음. 배양 종료 후 900 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하여 세포배양액을 회수하고 상등액 중에 유도된 NO 및 cytokine의 함량을 측정하였음.

(4) 면역활성 다당체의 구조 분석

(가) 일반 분석

- 다당 시료의 일반 성분을 분석하기 위해 중성당의 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid 법으로, 산성당의 함량은 D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl 법으로, 단백질의 함량은 bovine albumin을 표준물질로 하여 Bradford 법으로, TBA-positive material의 함량은 Kdo를 표준물질로 하여 thiobarbituric acid 법으로, 총 polyphenol의 함량은 gallic acid를 표준물질로 하여 folin-ciocalteu 법으로 각각 정량 분석하였음.

(나) 구성당 분석

- 구성당 분석은 Albersheim 등의 방법을 일부 변형하여 가수분해 후 각 구성당을 alditol acetate로 유도체화하여 gas chromatogram (GC)를 이용하여 분석하였음. 다당

시료를 2 M trifluoroacetic acid (TFA; Sigma) 중에서 121°C, 90분 반응시켜 가수분해한 후, 50 mg NaBH₄/1 M NH₄OH 1 mL을 제조하여 4시간 동안 환원시켰음. Acetic acid를 적당량 가하여 잔존 NaBH₄를 제거한 후, methanol을 가하며 반복 건조함으로써 과량으로 가해진 acetic acid를 제거하여 각 구성당에 상당하는 alditol로 전환하였음. 이 후 각각의 alditol은 300 μL의 acetic anhydride와 300 μL의 pyridine을 가하여 121°C에서 30분 동안 반응시켜 alditol acetate로 전환시켰으며 이를 chloroform/H₂O 2상 용매계로 분리하여 추출하고, 추출물은 건조 후 소량의 acetone에 용해하여 GC 분석용 시료로 사용하였음.

- 또한, 단편획분을 조제한 후 이용된 구성당 분석은 위의 실험방법과 달리 HPLC를 이용한 Honda 등의 방법을 일부 변형하여 2M TFA로 가수분해 후 각 구성당에 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP)을 붙여 DIW와 chloroform을 이용하여 상분리한 후, aqueous layer을 회수하여 filtration을 거쳐 0.1M phosphate buffer (pH 6.7):acetonitrile=82:18의 용매로 평형화된 Acclaim C18 column이 장착된 HPLC를 이용하여 254 nm에서 측정하였음.
- Alditol acetate 유도체의 GC분석 조건은 Table 1과 같으며, 각 구성당의 mole%는 각 유도체의 peak 면적, 분자량 및 flame ionization detector (FID)에 대한 molecular response factor를 각각 산출하여 계산하였음.

Table 86. Analytical condition of gas chromatography (GC) for component sugar analysis

| | |
|-----------------------|--|
| Apparatus | GC ACME-6100 (Young-Lin Co. Ltd., Korea) |
| Detector | Flame ionization detector (FID) (Young-Lin Co. Ltd., Korea) |
| Column | SP-2380 Capillary column (Supelco, USA) |
| Column size | 30 m × 0.25 mm, 0.2 μm Film thickness |
| Oven temp. | 60°C(1 min) → 220°C(12 min) → 250°C(15 min) 30°C/min 8°C/min |
| Injector temp. | 250°C |
| Detector temp. | 280°C |
| Carrier gas | N ₂ (1.0 mL/min) |

(다) 다당의 분자량 측정

○ 브로콜리 유래 효소처리 다당 시료의 분자량 측정을 위해 Superdex 75 GL (GE healthcare)을 이용하였으며, Table 87의 분석조건으로 HPLC-RID (High performance liquid chromatography-Refractive index detector)를 행하였음. 분자량 측정 시 이용된 표준물질인 pullulan series (P-800, 400, 200, 100, 50, 20, 10 및 5)를 이용하여 각각의 retention time을 구한 후, 각 분자량에 대한 Kav 값을 산출하여(Eq. 4) 얻은 표준곡선으로부터 환산하여 분자량을 결정하였음.

Table 87. Analytical condition of high performance liquid chromatography (HPLC) for the determination of molecular weights of polysaccharides

| | |
|-----------------------|--|
| Pump | 1260 infinity G1310B (Agilent Technologies Co., Ltd., Palo Alto, CA, USA) |
| Detector | Refractive index (1260 infinity G1362A, Agilent Technologies, USA) |
| Column | Superdex™ 75 GL (GE Healthcare BioSciences, Piscataway, NJ, USA) |
| Column size | 10 × 300 mm |
| Column temp. | 25°C |
| Flow rate | 0.5 mL/min |
| Eluent | 50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5) |
| Injection vol. | 20 µL |
| Integrator | Agilent data module (Agilent Technologies, USA) |

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Vt : total volume
 Vo : void volume
 Ve : elution volume of sample

(Eq. 4)

(라) β-Glucosyl Yariv reagent를 이용한 arabino-β-3,6-galactan (type II)의 존재 확인 및 정량

○ Arabino-β-3,6-galactan의 존재를 확인하기 위해 β-glucosyl Yariv reagent (Biosupplies, Parkville, Australia)와의 반응성 검토는 Holst와 Clarke의 방법에 따라 single radical 젤 확산법으로 측정하였음. β-Glucosyl Yariv reagent 10 µg/mL를 함유한 0.15 M NaCl agarose (1%) 평판을 조제하고 직경 2.5 mm의 pore을 만들어 농도

별로 희석한 표준물질 gum arabic과 브로콜리 유래 효소처리 조다당 및 정제 다당 시료 5 μg 을 함유한 용액을 well에 각각 주입하였음. 이 평판을 습윤상태에서 25°C에서 15시간 정치시켜 반응시키고, 생성된 붉은색 침전 환을 관찰하여 arabino- β -3,6-galactan의 존재 유무를 관찰하였음. 시료와 β -glucosyl Yariv reagent와의 반응성은 생성된 침전환의 넓이를 계산하여 상호 비교하였음.

(마) Methyl화 분석에 의한 구조 및 결합위치 결정

① Methylsulfinyl carbanion의 조제

○ Methylsulfinyl carbanion을 조제하기 위해 무수 NaH 1.26 g에 무수 DMSO (dimethylsulfoxide) 20 mL을 첨가한 후 질소로 충전하며 90°C oil bath 하에서 약 10-15분간 반응시켰음. 반응액이 옅은 녹색을 띠는 시점을 종말점으로 하여 반응을 종결하고 상온까지 냉각시킨 후 2,500 rpm, 30°C에서 원심분리하였음. Methylsulfinyl carbanion이 함유된 상등액은 공기의 접촉이 없도록 질소로 치환하여 소량씩 분주한 후 냉동보관하며 사용하였음.

② Methylation analysis

○ 다당 시료의 결합위치를 결정하기 위한 methyl화는 Hakomori 방법을 이용하여 실시하였음. 브로콜리 유래 정제 다당인 BCE-I과 BCE-II를 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 조제한 뒤, cap tube에 0.7 mL과 20 μL 의 glycerol을 넣고 건조시켰음. 테시케이터에서 1-2일간 충분히 건조한 시료에 무수 DMSO를 가하고 교반하여 4일간 용해시킨 후, 500 μL methylsulfinyl carbanion (MSCA)를 가하여 4시간 동안 반응시켰음. 이때 다당이 완전히 polyalkoxide로 전환될 수 있도록 필요한 경우 MSCA를 추가로 첨가하였으며 미반응 MSCA의 잔존 여부는 triphenylmethane으로 확인하였음. Polyalkoxide로 전환된 시료는 1 mL의 CH_3I 를 가하여 methyl화 하였으며, 잔존 CH_3I 는 N_2 gas flushing을 통해 제거 후 Sep-pak C_{18} cartridge (Waters, Millford, MA, USA)를 이용하여 회수하였음.

③ Methyl화 다당의 가수분해 및 acetyl화

○ Methyl화된 시료는 2 M TFA 1 mL을 가하여 121°C, 1.5시간 반응시켜 가수분해를 행한 후 건조하였음. 가수분해한 시료는 1 M NH_4OH (수 drops) 첨가된 ethanol 1 mL에 용해하고 20 mg의 NaBH_4 를 가하여 4시간 동안 개환 및 환원하였으며, acetic acid를 적당량 가하여 잔존 NaBH_4 를 제거하고, methanol을 가하며 반복 건조함으로써 과량으로 가해진 acetic acid를 제거하였음. 이 후 1 mL의 acetic anhydride를 가하고, 121°C에서 3시간 동안 반응시켜 partially methylated alditol acetate로 전환하였으며, 이는 2상 용매계(chloroform, H_2O)로 분리, 추출하여 acetone에 용해시켜

GC-MS로 분석하였음.

④ Partially methylated alditol acetate의 GC-MS 분석

- GC-MS는 SP-2380 capillary column을 장착한 Agilent 6890N GC system과 5975N mass spectrometry (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 GC-MS의 분석 조건은 Table 88과 같으며, 각 구성당의 mole%는 각 유도체의 peak 면적, 분자량 및 FID에 대한 molecular response factor를 각각 산출하여 계산하였음. methyl화된 시료의 유도체는 GC-mass spectrometry (MS)에 의한 fragment ion 분석과 GC의 relative retention time을 조합하여 동정하였으며 각 peak의 mole%는 peak area 및 molecular response factor로 부터 환산하였음.

Table 88. Analytical condition of gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) for methylation alditol acetate analysis

| | |
|----------------|---|
| Apparatus | Agilent 6890N GC (Agilent Technologies Co., Ltd., Palo Alto, CA, USA) |
| Detector | Agilent 5975 MSD (Agilent Technologies Co., Ltd., Palo Alto, CA, USA) |
| Column | SP-2380 capillary column (Supelco, USA) |
| Column size | 30 m×0.25 mm, 0.2 μm film thickness |
| Oven temp. | 60°C(1min) → 150°C → 180°C → 231°C → 250°C (10min) 30°C/min 1°C/min 1.5°C/min 30°C/min |
| Injector temp. | 250°C |
| Detector temp. | 280°C |
| Carrier gas | N ₂ (1.0 mL/min) |

(5) 단편획분을 통한 미세구조 확인

(가) BCE-I의 구조분석을 위한 단편조제

- BCE-I의 전체구조를 추정하기 위해서는 구조분석이 용이한 단편(분자량이 작은 oligo 당)으로 분해하고 이를 정제하여 해석해야 하므로 이를 위해 일련의 효소처리에 의한 가수분해를 행하였음. 이때 사용한 효소는 단편 oligo당의 분리가 용이한 조건을 설정하기 위해, 예비실험을 통하여 분해에 적합한 효소인자[Exo-α-L-arabinofucosidase(from *A. niger*)(E-AFASE), exo-α(1-2,3,4,6)-L-fucosidase(from *Homo sapiens*)(E-FUCHS), exo-α-D-glucuronidase(from *Geobacillus stearothermophilus*)(E-AGUBS) 및

galactan-1,3- β -galactosidase(from *Clostridium thermocellus*)]를 확인하였으며 적절한 효소(E-AFASE, E-FUCHS, E-AGUBS 및 galactan-1,3- β -galactosidase)로 판명된 경우, 제조사가 제공한 처리조건을 실험실 조건에 맞게 응용하여 사용하였음.

(나) E-AFASE, E-FUCHS 및 E-AGUBS에 의한 가수분해 및 단편조제

- BCE-I 시료 300 mg에 50 mM ammonium formate buffer (pH 4.0)에 용해시키고 각각 5 unit의 exo- α -L-arabinofucosidase(from *A. niger*)와 exo- α -(1-2,3,4,6)-L-fucosidase(from *Homo sapiens*)(Megazyme International Ireland Ltd., Ireland)를 가하여 50°C 항온수조에서 48시간 가수분해를 행하고, 여기에 50 mM ammonium formate buffer (pH 7.0)로 조정하고, 5 unit의 exo- α -D-glucuronidase(from *Geobacillus stearothermophilus*)를 가하여 70°C 항온수조에서 24시간 가수분해를 재차 행하였음. 이후, 100°C로 20분간 중탕하여 잔존효소활성을 정지시켰음. 이 반응물을 원심분리하여 침전된 불활성 효소 단백을 제거하고 그 상등액은 50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5)로 평형화된 SuperdexTM 75 GL column을 이용하여 HPLC상에서 분획하고 중성당 및 산성당 분석을 진행한 후, 탈염 및 동결건조를 거쳐 분자량 및 구성 성분이 상이한 2개의 획분 BCE-I-1a과 BCE-I-1b를 획득하였음 (Fig. 4).

(다) Galactan-1,3- β -galactosidase에 의한 가수분해 및 단편조제

- E-AFASE, E-FUCHS 및 E-AGUBS 처리 과정에서 얻어진 BCE-I-1a 시료에 50 mM Ammonium formate buffer (pH 6.0)를 가하여 용해시킨 후, galactan-1,3- β -galactosidase(from *Clostridium thermocellus*)(Megazyme International Ireland Ltd., Ireland) 5 unit을 가하여 50 °C 항온수조에서 48시간 처리해 주었음. 효소반응의 정지를 위해 100°C 20분간 중탕하고 원심분리하여 상등액을 얻었으며, 이를 50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5)로 평형화된 SuperdexTM 75 GL column을 이용하여 HPLC상에서 분획하였음. 이때 분자량 및 구성 성분이 상이한 3개의 획분 BCE-I-2a, BCE-I-b 및 BCE-I-2c를 획득하였으며, 이를 탈염 및 동결건조하여 구조분석에 사용하였음(Fig. 4).

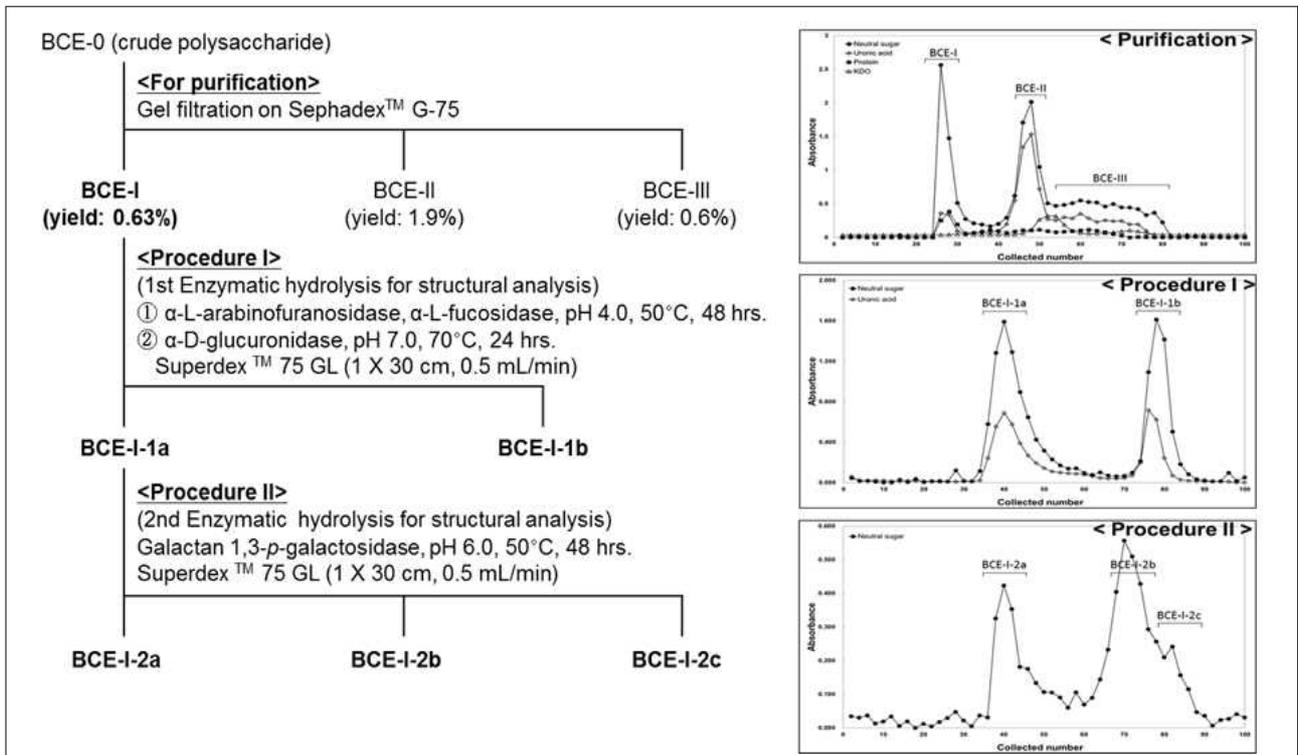


Fig 196. Purification scheme of anti-metastatic polysaccharide (BCE-I) from broccoli and procedures of sequential degradation for structural analysis of BCE-I

(6) 통계처리

- 실험결과는 IBM SPSS Statistics 21 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하여 통계 처리하였으며 모든 측정 항목에 대한 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었음. 시료 및 처리농도 간 유의적인 차이는 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test 일원배치 분산분석으로 실시하였음.

2. 결과 및 고찰

가. PEF 처리된 십자화과 식물들(브로콜리, 적양배추, 방울양배추, 무)의 화학적 특성

- 십자화과 식물 4 종의 에탄올 추출물, 열수추출물 및 조다당 시료를 Fig. 1과 같은 방법으로 제조하여 얻은 후 수율을 측정한 결과 브로콜리 유래 단순 열수 추출 시료 BRHW-0와 조다당 추출 시료 BRWP-0에서 각각 1.21%, 2.15%의 가장 높은 수율을 나타내었음.
- 또한, 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울 양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]의 일반 성분 분석 결과(Table 89), 4 종의 조다당 시료 모두 중성당보다 산

성당 함량이 높았으며, 그 비율이 시료마다 조금씩 차이가 있었음. 이 중 방울 양배추 조다당(BSWP-0)이 65.4%로 산성당 함량이 가장 높았으며, 무 조다당(RAWP-0)에서만 단백질이 소량 검출되었음.

Table 89. General analysis of crude polysaccharides isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish.

| General analysis (%) | BRWP-0 | RCWP-0 | BSWP-0 | RAWP-0 |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|
| Neutral sugar | 49.3 ± 0.4 | 44.3 ± 2.3 | 34.6 ± 3.5 | 48.6 ± 3.9 |
| Uronic acid | 50.7 ± 1.3 | 55.7 ± 1.2 | 65.4 ± 2.0 | 50.2 ± 1.1 |
| Protein | 0.0 ± 0.4 | 0.0 ± 1.4 | 0.0 ± 1.0 | 1.2 ± 0.7 |

○ 총 8 종의 단순 열수추출 시료[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울 양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]와 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울 양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]는 50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5)로 평형화된 Sephadex 75 GL column을 이용하여 HPLC를 행하여 전체 구성 조다당의 분자량에 따른 분포를 관찰한 결과, Fig. 5와 Fig. 6에서와 같이 단순 열수 추출 시료[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울 양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]에서 검출되었던 저분자 물질들이 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울 양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]의 HPLC chromatogram에서 확인한 바, 저분자 물질이 제거되면서 고분자 물질이 부각되어 분석되었다는 것을 알 수 있었음.

○ 이는 단순 열수추출 시료[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울 양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]보다는 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울 양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]에서 면역증진활성, 항암활성 및 기타 약리활성에 기여한다고 알려진 식물체 유래 고분자 다당만이 주 구성분자로 함유하고 있다는 것을 알 수 있었음.

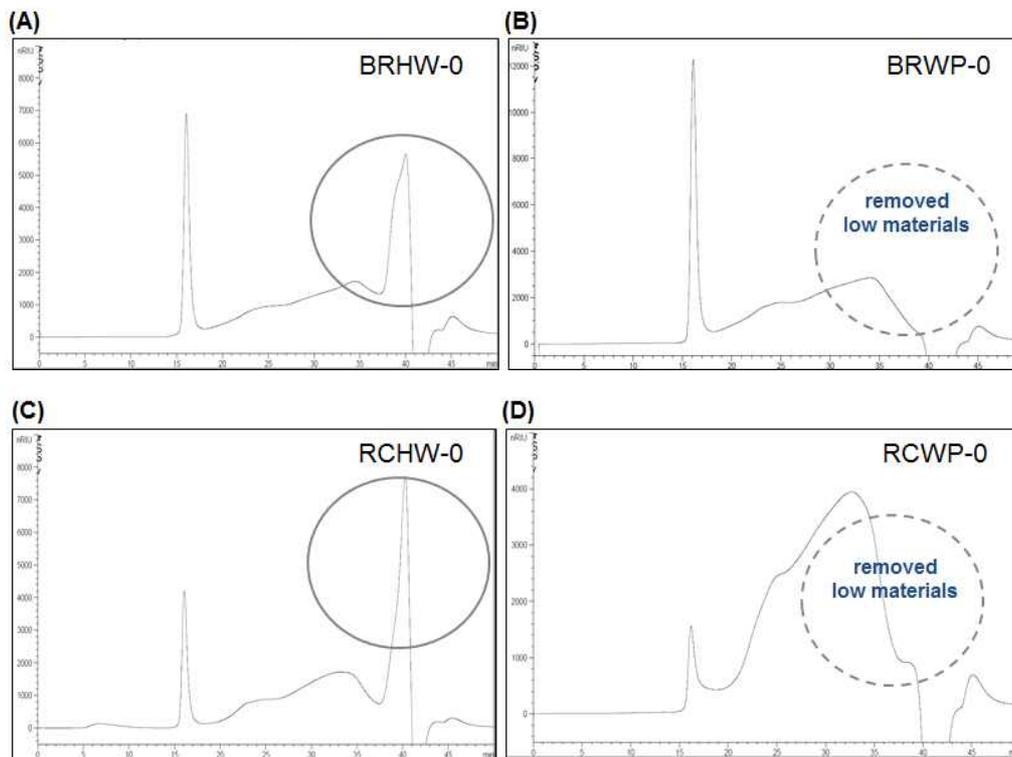


Fig 197. Elution patterns of hot water extracts and crude polysaccharides isolated from broccoli and red cabbage on size-exclusion HPLC. HPLC equipped with Superdex 75 GL column.

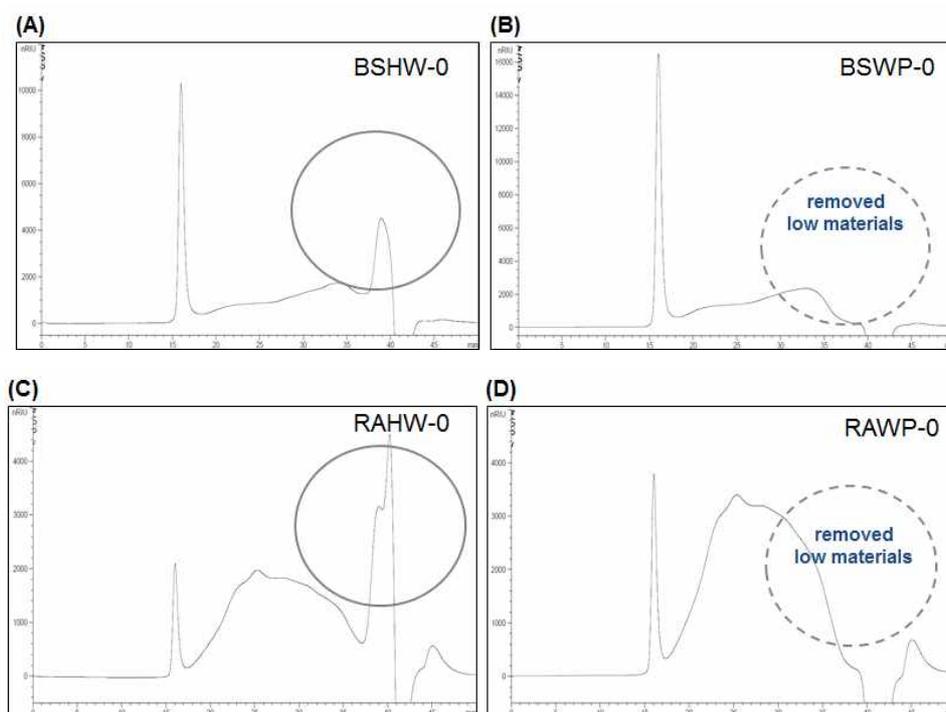


Fig 198. Elution patterns of hot water extracts and crude polysaccharides isolated from brussels sprout and radish on size-exclusion HPLC. HPLC equipped with Superdex 75

GL column.

- 이로써, 알콜 추출물에 의한 시료 10 종[브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)], 단순 열수 추출물에 의한 시료 4 종[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울 양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]과 조다당 시료 4 종[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울 양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)], 총 18 종의 시료를 이용하여 *in vitro* 평가를 통해 스크리닝한 후, 면역 및 항암활성이 가장 우수한 십자화과 식물을 선별하기로 함.

나. PEF 처리된 십자화과 식물 유래 시료의 *in vitro* 상에서 항암활성 평가 스크리닝

(1) Mouse 유래 정상세포 murine peritoneal macrophages의 세포 독성 측정

- 인체에 병원체가 침입했을 때 가장 먼저 대응하는 세포들은 neutrophil(호중구), monocyte(단핵구) 및 macrophage(대식세포)와 같은 탐식세포(phagocytes)들로, 이들은 선천 면역반응의 주요 세포군을 형성하고 있음.
- 이 중에서 대식세포는 호중구와 함께 상피세포 장벽 이후의 생체방어에 있어 최초 대응세포로 계통 발생학적으로 모든 동물류에서 관찰됨. 또한, 항원제시세포(antigen presenting cell)로서의 기능도 수행하는데 후천적 면역반응을 조절하는 T-lymphocyte와 반응하여 이후의 면역반응에도 영향을 주게 됨.
- PEF 처리된 십자화과 식물 유래 알콜 추출 시료[브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)]만을 이용, mouse의 복강으로부터 분리한 macrophage에 대한 직접 독성 여부를 측정하였음.
- 2×10^6 cells/mL로 조정된 세포주에 위에 명시된 시료들을 1.6 ~ 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 까지의 다양한 농도로 가하여 배양한 후 세포의 생존여부를 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 7에 나타난 바와 같이 알콜 추출 시료[브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)] 모두 정상세포에 대한 독성을 나타내지 않았음.

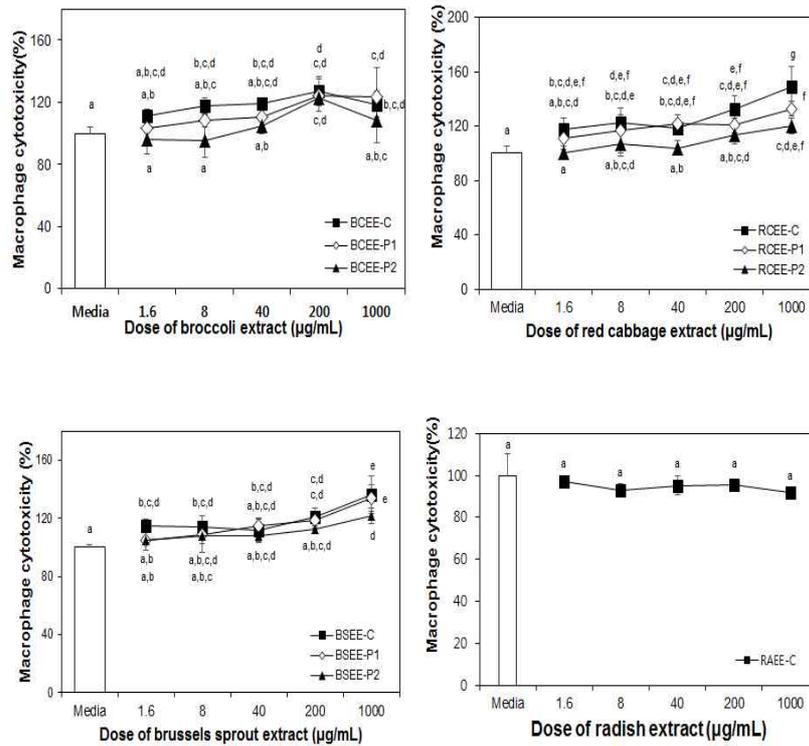


Fig 199. Effect of anti-tumor activity of ethanol extracts isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish on murine peritoneal macrophage cells *in vitro*. Bars with lower case letters (a-g) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

(2) Mouse 및 human 유래 종양세포에 대한 세포 독성 측정

- 각종 mouse 및 human 유래 종양세포주(Table 90)를 대상으로 십자화과 식물의 알콜 추출 시료[브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)]의 직접적인 세포 독성에 의한 항암 활성을 측정함.
- 대상 종양세포주는 최근 국내 암환자의 사망 원인 비율이 가장 높은 폐암 세포주와 발병 비율이 급상승 중인 대장암 세포주를 중심으로 측정하되 대상 세포주를 늘려가며 확인함.

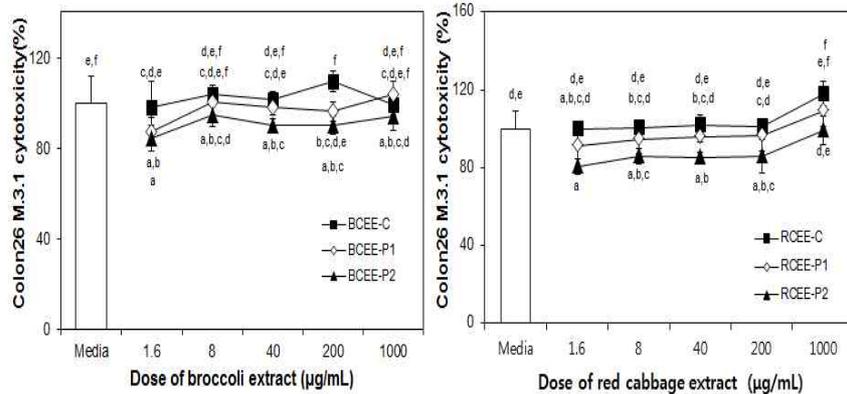
Table 90. Species of mouse and human cancer cell lines

| Source | Mouse cancer cell line | Human cancer cell line |
|--------|------------------------|------------------------|
| Lung | B16BL6 | A549 HCI-H460 |
| Colon | Colon26-M3.1 | HT29 SW620 |

(가) Mouse 유래 종양세포에 대한 세포 독성 측정

○ Mouse 유래 대장암 종양세포주인 Colon26-M3.1 carcinoma cell line과 폐암 종양세포주인 B16BL6 melanoma cell line을 이용하여 알콜 추출 시료[브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)]의 암세포에 대한 직접적인 독성측정 실험을 수행하였음.

○ 1×10^5 cells/mL로 조정된 세포주에 위에 명시된 시료들을 1.6 ~ 10,000 $\mu\text{g/mL}$ 까지의 다양한 농도로 가하여 2 일간 배양한 후 세포의 생존여부를 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 8에 나타난 바와 같이 mouse 유래 Colon26-M3.1 colon cancer cell line의 경우, 알콜 추출 시료[브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1), 무(RAEE-C)] 1.6 ~ 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 모든 농도에서 항암활성을 나타내지 않았음. 그러나 방울양배추 알콜 추출 시료 BSEE-P2만이 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 약 30%의 암세포 사멸을 나타내었음.



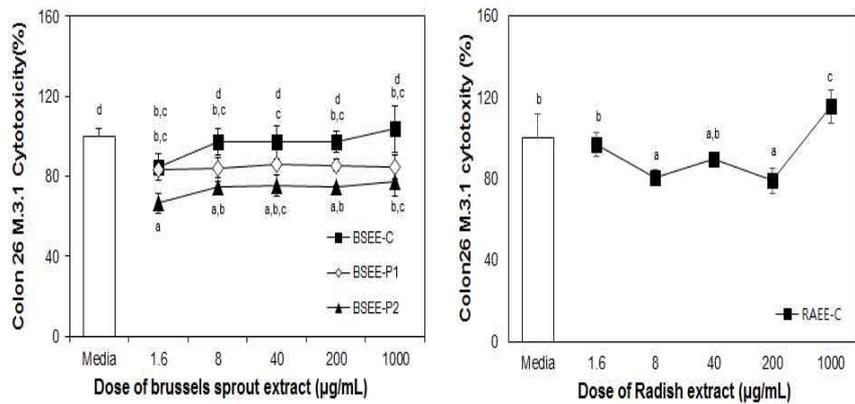
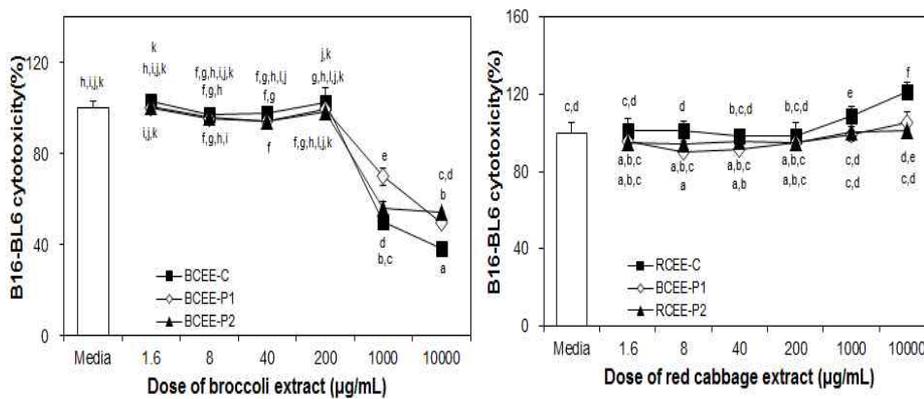


Fig 200. Effect of anti-tumor activity of ethanol extracts isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish on Colon26-M3.1 carcinoma cell lines *in vitro*. Bars with lower case letters (a-d) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

○ 이와 반대로, mouse 유래 B16BL6 lung cancer cell line의 경우 알콜 추출 시료[브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)] 1.6 ~ 10,000 µg/mL의 고농도에서 세포의 생존 여부를 확인한 결과(Fig. 9), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C) 유래 알콜 추출 시료에서는 1,000 µg/mL의 농도 이상에서부터 암세포가 사멸되는 것을 확인 할 수 있었음.



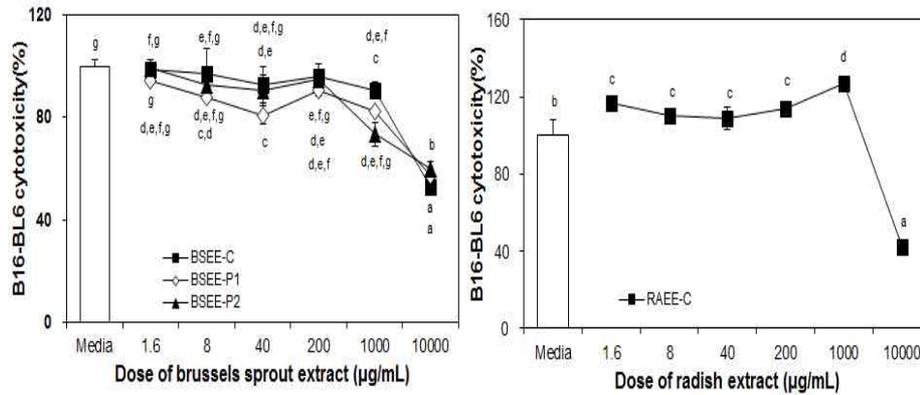


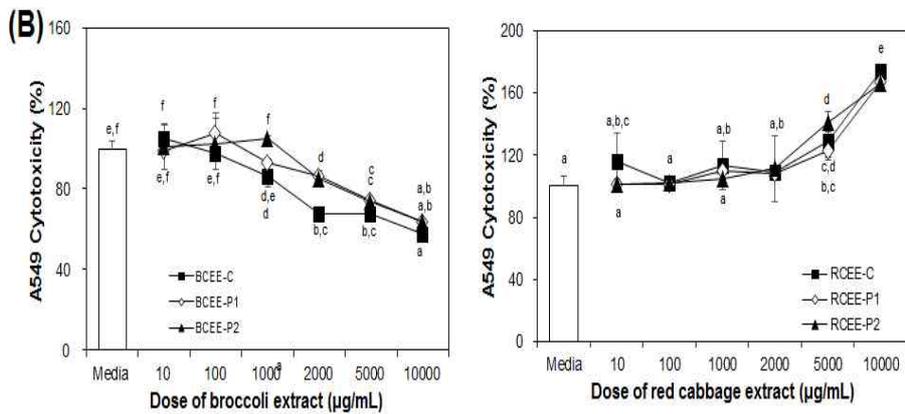
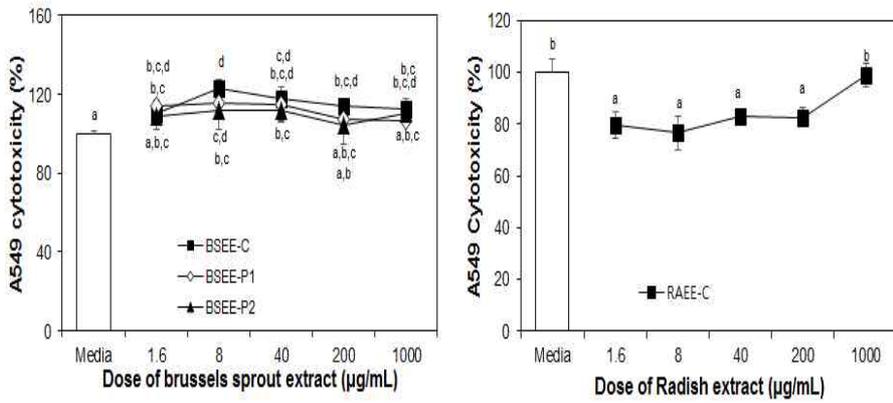
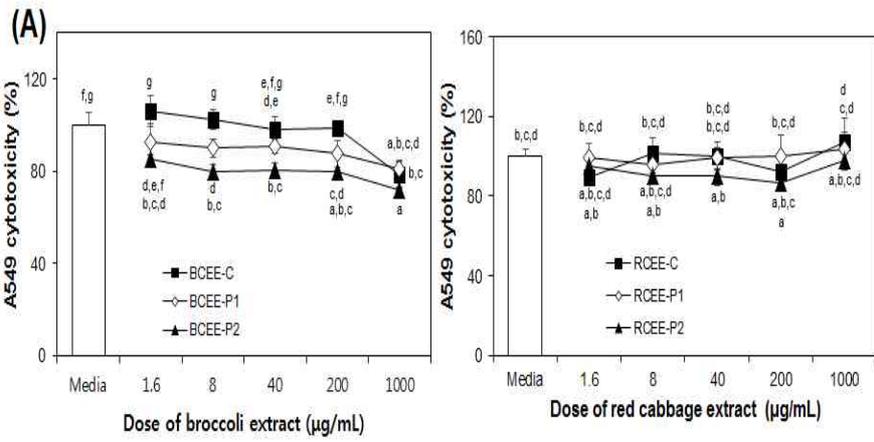
Fig 201. Effect of anti-tumor activity of ethanol extracts isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish on B16BL6 melanoma cell lines *in vitro*. Bars with lower case letters (a-k) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

○ 브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2) 유래 알콜 추출 시료는 200 µg/mL의 저농도 이상에서부터 세포가 사멸되었고, 특히 10,000 µg/mL의 고농도에서는 약 50%의 세포 사멸을 나타내 항암활성이 가장 우수하다는 것을 확인할 수 있었음. 또한, 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2) 시료의 경우에는 10,000 µg/mL의 고농도에서도 암세포가 사멸되지 않았음.

(나) Human 유래 종양세포에 대한 세포 독성 측정

① 폐암 종양세포주에 대한 세포 독성 측정

- Human 유래 폐암 종양세포주인 A549 cancer cell line과 NCI-H460 cancer cell line을 이용하여 알콜 추출 시료[브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)]의 세포에 대한 직접적인 독성측정 실험을 수행하였음.
- 1×10^5 cells/mL로 조정된 세포주에 위에 명시된 시료들을 1.6 ~ 10,000 µg/mL까지의 다양한 농도로 가하여 2 일간 배양한 후 세포의 생존여부를 확인하였음.
- Human 유래 A549 lung cancer cell line의 경우 알콜 추출 시료[브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)] 1.6 ~ 1,000 µg/mL의 농도에서 세포의 생존 여부를 확인한 결과(Fig. 10(A)), 모든 시료에서 암세포가 사멸되지 않았음.



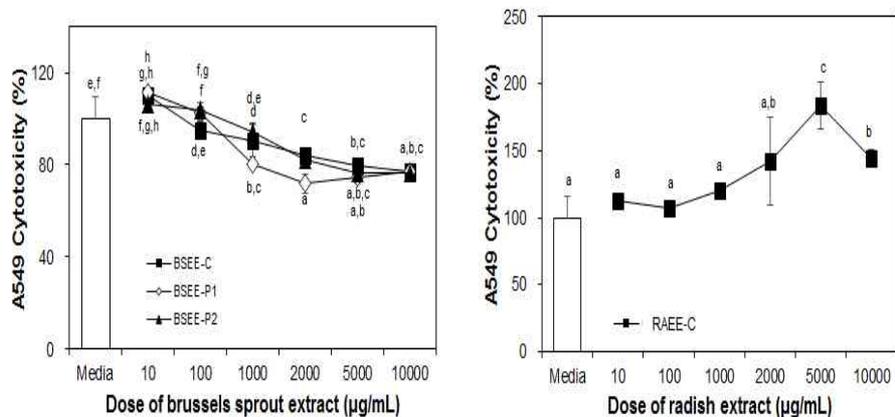


Fig 202. Effect of anti-tumor activity of ethanol extracts isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish on A549 cancer cell lines *in vitro*. Bars with lower case letters (a-f) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

- 위의 결과를 바탕으로 시료의 농도를 1,000 ~ 10,000 µg/mL의 고농도에서 암세포에 대한 생존여부를 확인하고자 재실험을 진행한 결과(Fig. 10(B)), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 무(RAEE-C) 시료의 경우 10,000 µg/mL의 고농도에서도 암세포 사멸이 일어나지 않았음.
- 반면, 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2) 시료는 2,000 µg/mL 이상의 농도에서 약 20% 이상의 세포 사멸이 일어났으며, 브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2) 시료의 경우 1,000 µg/mL 이상의 고농도에서부터 암세포 사멸이 일어나 10,000 µg/mL의 고농도에서는 약 40%의 세포 사멸을 일으켜 항암활성이 가장 우수할 것이라 예측되었음.
- Human 유래 NCI-H460 lung cancer cell line의 경우 알콜 추출 시료[브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)] 1.6 ~ 10,000 µg/mL의 농도에서 세포의 생존 여부를 확인한 결과(Fig. 11), 브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C) 시료에서는 1,000 µg/mL 이상의 농도에서 암세포의 사멸을 나타내었으나, 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2) 시료의 경우에는 10,000 µg/mL의 고농도에서도 암세포의 사멸이 일어나지 않았음.
- 특히, 브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2) 시료의 경우 10,000 µg/mL의 고농도에서 약 80% 이상의 암세포 사멸을 나타내 이전 결과와 동일하게 가장 우수한 항암

활성을 나타내었음.

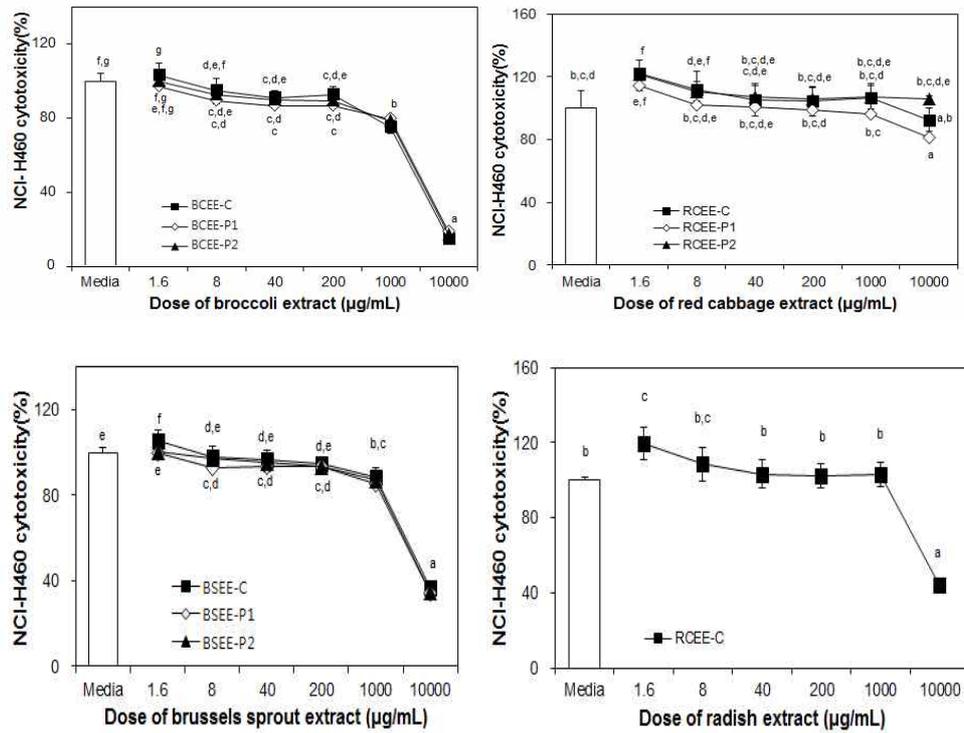


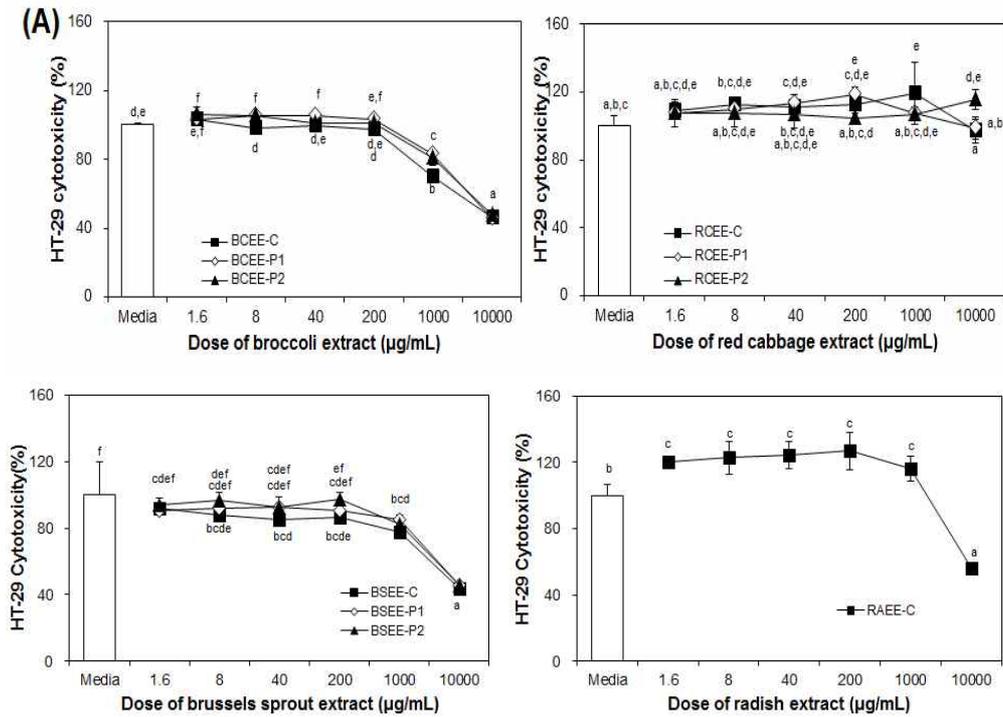
Fig 203. Effect of anti-tumor activity of ethanol extracts isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish on NCI-H460 cancer cell lines *in vitro*. Bars with lower case letters (a-f) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

② 대장암 종양세포주에 대한 세포 독성 측정

- Human 유래 대장암 종양세포주인 HT29 cancer cell line과 SW620 cancer cell line을 이용하여 알콜 추출 시료[브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)]의 세포에 대한 직접적인 독성측정 실험을 수행하였음.
- 1×10^5 cells/mL로 조정된 세포주에 위에 명시된 시료들을 1.6 ~ 10,000 µg/mL까지의 다양한 농도로 가하여 2 일간 배양한 후 세포의 생존여부를 확인하였음.
- Human 유래 HT29 colon cancer cell line의 경우 알콜 추출 시료[브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)] 1.6 ~ 10,000 µg/mL의 농도에서 세

포의 생존 여부를 확인한 결과(Fig. 12(A)), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C) 시료에서는 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 이상에서, 브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2) 시료는 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 저농도 이상에서부터 암세포가 사멸되는 것을 알 수 있었음.

○ 반면, 적양배추는 10,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서도 세포 사멸이 일어나지 않았음.



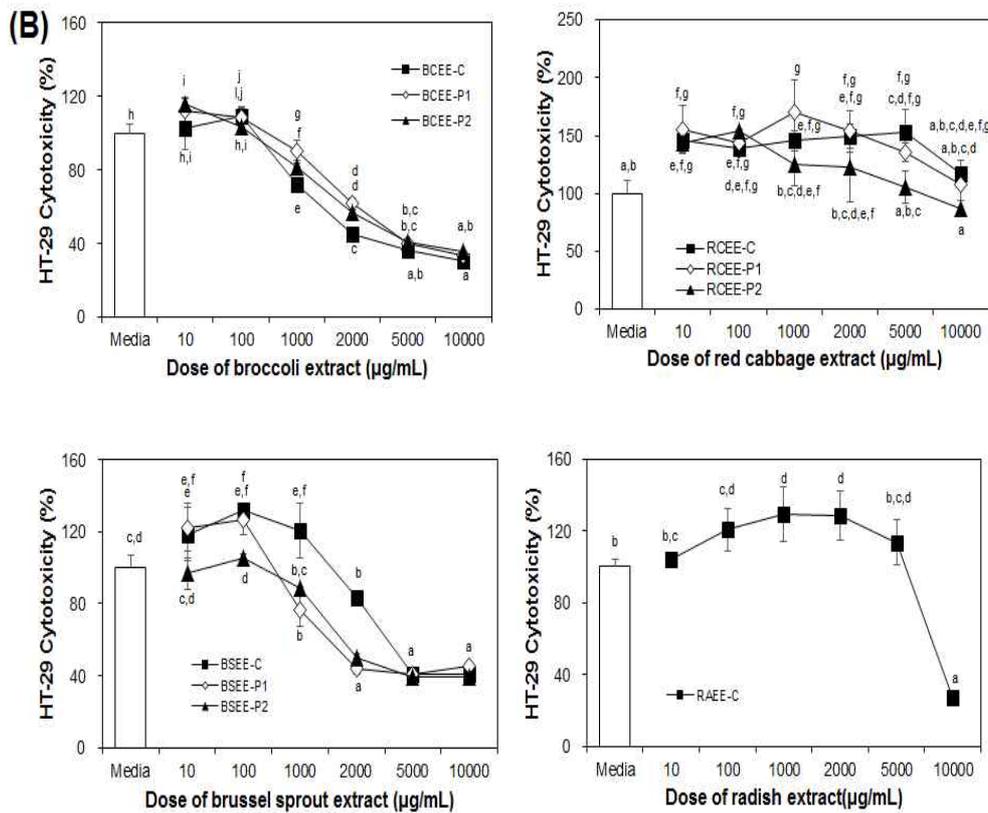


Fig 204. Effect of anti-tumor activity of ethanol extracts isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish on HT29 cancer cell lines *in vitro*. Bars with lower case letters (a-f) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

- 위의 결과를 바탕으로 시료의 농도를 1,000 ~ 10,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서 암세포에 대한 생존여부를 재차 확인하고자 재실험을 진행한 결과(Fig. 12(B)), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2) 시료의 경우 10,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서 세포 사멸이 일어나지 않음을 재차 확인하였고, 무(RAEE-C) 시료의 경우 5000 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도 이상에서 암세포 사멸이 일어나면서 10,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서는 약 70%의 세포 사멸이 일어난 것을 알 수 있었음.
- 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2) 시료의 경우 1,000 ~ 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 BSEE-P1과 BSEE-P2가 BSEE-C보다 약간 우수한 세포 사멸을 나타내었지만, 고농도로 갈수록 BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2 시료 모두 동일한 결과를 나타내 약 60%의 암세포 사멸이 일어난다는 것을 확인 할 수 있었음.
- 브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2) 시료도 마찬가지로 이전 실험과 동일하게 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 저농도 이상에서부터 암세포 사멸이 일어난다는 것을 재차 확인하였음.

- Human 유래 SW620 colon cancer cell line의 경우 알콜 추출 시료[브로콜리 (BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)] 1.6 ~ 10,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 세포의 생존 여부를 확인한 결과(Fig. 13), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2)의 경우에는 10,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서도 암세포의 사멸이 일어나지 않았음.
- 반면, 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C) 시료에서는 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 세포의 사멸을 나타내었으며, 브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2) 시료의 경우 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 저농도 이상에서부터 세포 사멸이 일어나 항암 활성에 가장 우수한 시료로 재차 확인되었음.

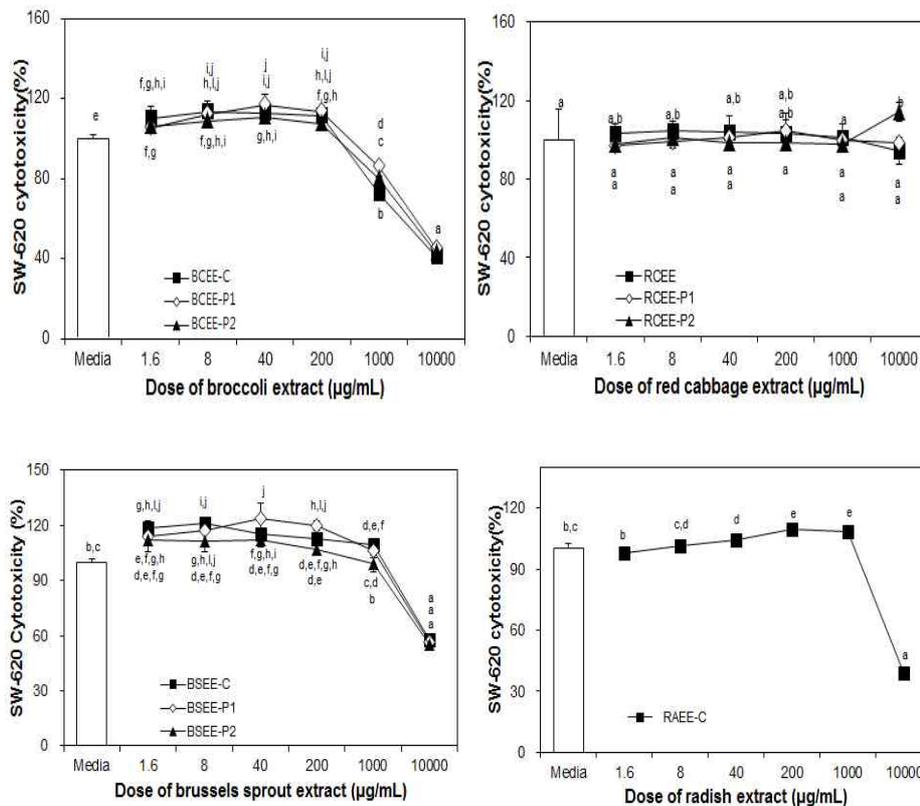


Fig 205. Effect of anti-tumor activity of ethanol extracts isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish on SW620 cancer cell lines *in vitro*. Bars with lower case letters (a-j) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

(3) PEF 처리 십자화과 식물 유래 시료의 림프구 증식 활성(Splenic lymphocyte proliferation)

- 비장(spleen)은 혈액으로부터 항원을 수집하여, B 및 T 림프구의 성숙과 항원에 의해 자극받은 후 림프구의 분화가 이루어지는 주요 림프기관으로 비장 내 림프구의 증식은 면역시스템에 있어 매우 중요한 의미를 갖음.
- BALB/c mouse의 비장으로부터 획득한 림프세포에 알콜 추출 시료[브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)]를 가하여 그 증식 정도를 측정한 결과 (Fig. 14.), 무첨가 대조군의 림프구의 증식정도를 100%라 할 때 알콜 추출 시료[브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)] 모두 유효한 증식활성은 나타나지 않았음.

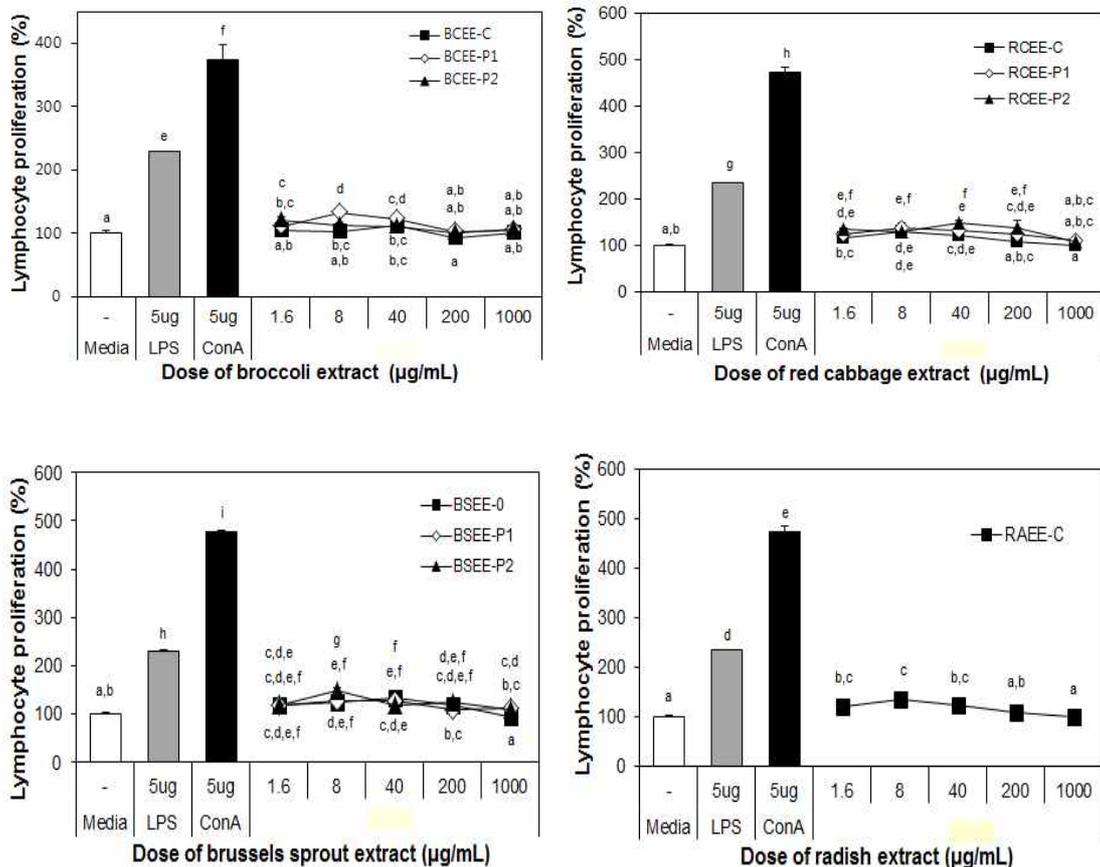


Fig 206. Lymphocyte proliferation activity of ethanol extracts isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish. Bars with lower case letters (a-i) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

(4) PEF 처리 십자화과 식물 유래 시료가 대식세포(macrophage)의 cytokine 생산에 미치는 영향

- Macrophage는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 cytokine을 분비하여 면역현상을 조절하며, 항원에 대한 면역작용의 중추적인 역할을 하는 세포로서, 항원제시와 림프구의 비특이적 면역작용에 관계하며, 종양세포에 대해서는 직접적인 상해활성을 나타냄. 또한 TLR(tool-like receptor)에 반응하는 물질(LPS 혹은 천연물)은 macrophage를 활성화하여 T세포와 B 세포의 증식, 식균 작용을 위한 대식세포의 활성화, 미생물 감염에 대한 방어 등의 2차 면역반응을 조절할 수 있는 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF- α 와 같은 cytokine을 생산한다고 알려져 있음.
- IL-1, IL-6 및 TNF- α 는 macrophage에 의해 유도되는 대표적인 cytokine 으로 세균감염에 따른 염증반응에 있어서 중추적인 역할을 하며 염증병소에서 그 양이 증가되는 것으로 알려져 있음. IL-6는 IL-1과 협동적으로 작용하여 T 세포와 B 세포의 분화에 관여하고 항암효과가 있다고 보고되었으며, TNF- α 은 특정암세포에 대한 세포독성과 항바이러스성 작용이 있고, 급성 및 만성 염증질환에서 일어나는 여러 가지 생체반응에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있음.
- 한편, IL-12는 NK cell의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응을 유도하는 cytokine으로써 암세포와 같은 세포성 외래물질에 대한 반응성을 높이는 작용을 한다고 알려져 있음. 또한 IL-10은 macrophage에 의한 TNF, IL-1, chemokine 및 IL-12의 생성을 교차조절(cross-regulation)함으로써 T 림프구 활성화에 있어 대식세포의 부수적 기능(T 림프구 매개성 특이면역염증반응)을 저해한다고 알려져 있음.
- 알콜 추출 시료[브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)]의 직접적인 자극에 의한 macrophage의 cytokine 생산을 *in vitro*에서 측정한 결과, IL-6(Fig. 15), IL-12(Fig. 16) 및 TNF- α (Fig. 17)의 경우 모두 PEF 처리에 관계없이 활성이 나타나지 않았음.

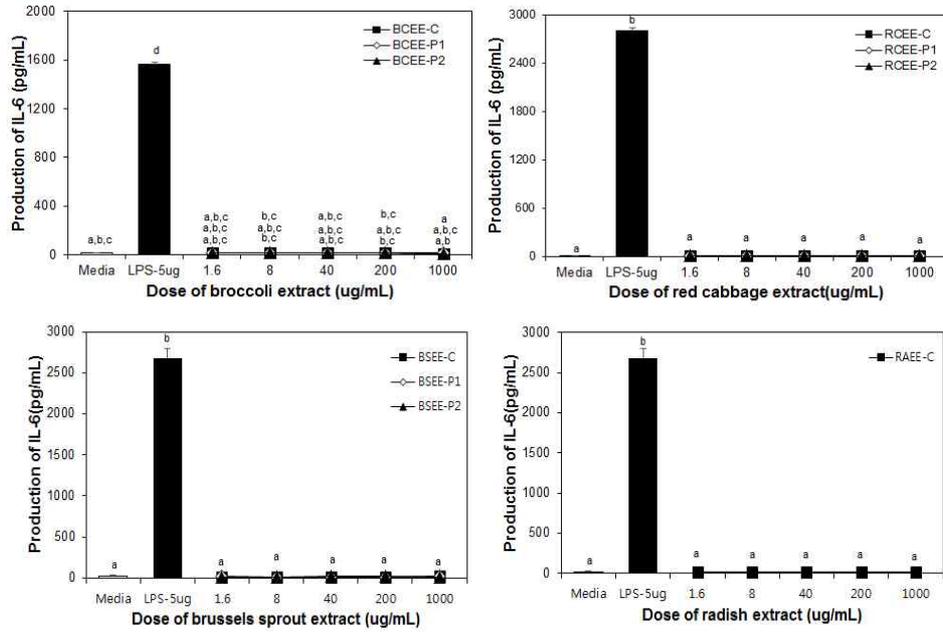


Fig 207. Effect of hot water extracts and crude polysaccharides isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish on production of IL-6 by murine peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages (2.5×10^6 /mL) were treated with various concentrations of hot water extracts [broccoli (BRHW-0), red cabbage (RCHW-0), brussels sprout (BSHW-0), radish (RAHW-0)] and crude polysaccharides [broccoli (BRWP-0), red cabbage (RCWP-0), brussels sprout (BSWP-0), radish (RAWP-0)] in 96-well plate for 24h. The concentrations of IL-6 in the medium were determined by ELISA kits. A total of 5 μ g/mL lipopolysaccharide (LPS) and 1000 μ g/mL CVT-100 were used as the PC (positive control) and only media was used as the NC (negative control). Bars with lower case letters (a-d) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

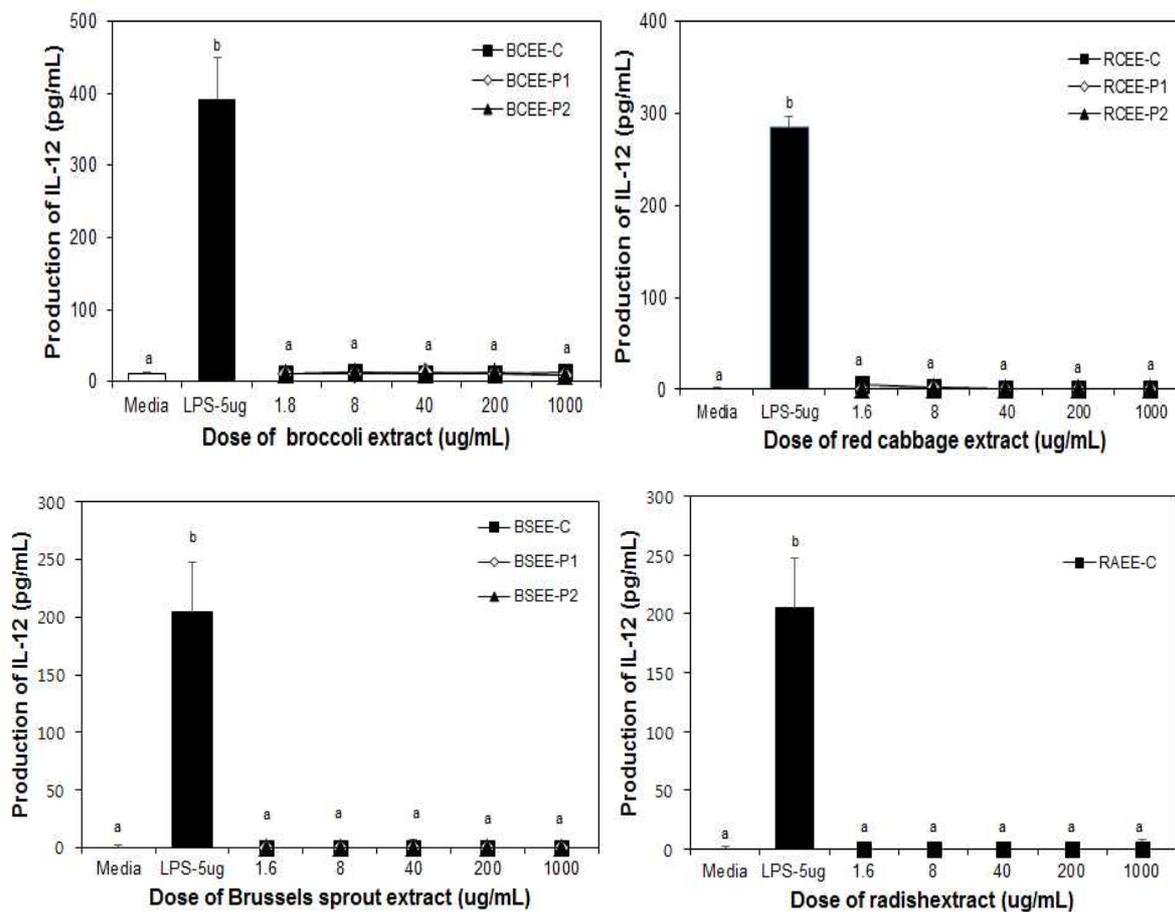


Fig 208. Effect of hot water extracts and crude polysaccharides isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radsh on production of IL-12 by murine peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages (2.5×10^6 /mL) were treated with various concentrations of hot water extracts [broccoli (BRHW-0), red cabbage (RCHW-0), brussels sprout (BSHW-0), radish (RAHW-0)] and crude polysaccharides [broccoli (BRWP-0), red cabbage (RCWP-0), brussels sprout (BSWP-0), radish (RAWP-0)] in 96-well plate for 24h. The concentrations of IL-12 in the medium were determined by ELISA kits. A total of 5 μ g/mL lipopolysaccharide (LPS) and 1000 μ g/mL CVT-100 were used as the PC (positive control) and only media was used as the NC (negative control). Bars with lower case letters (a-b) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

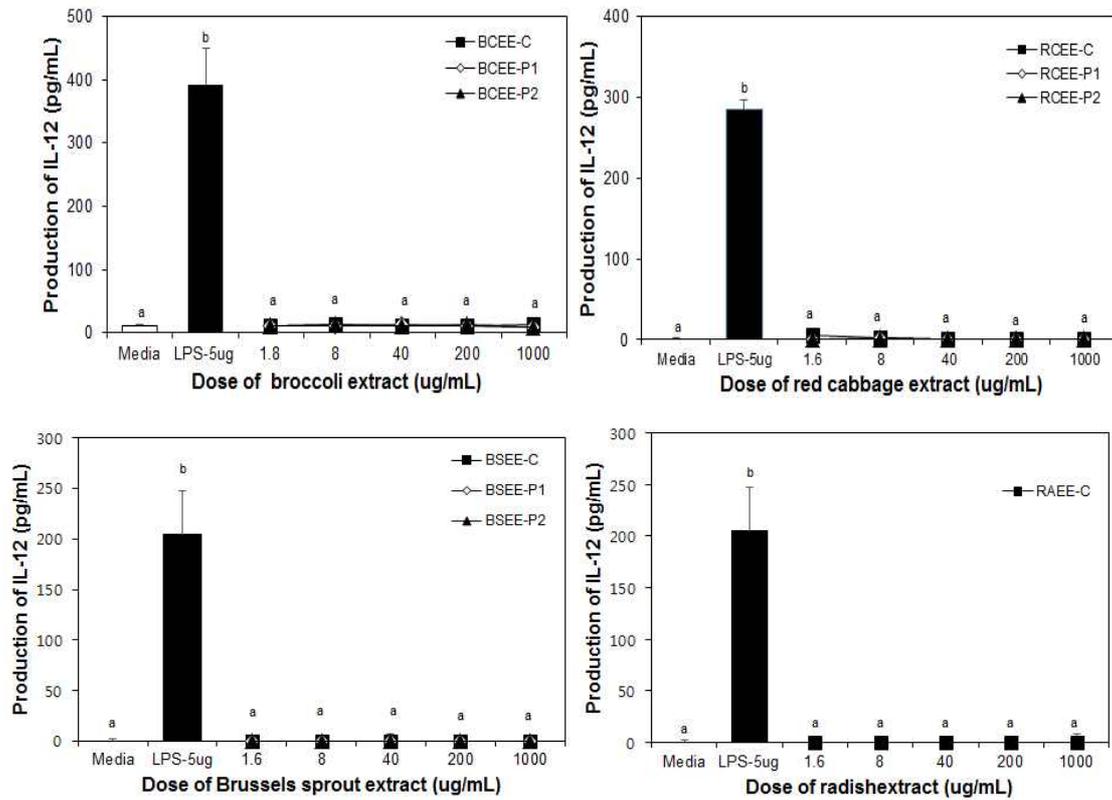


Fig 209. Effect of hot water extracts and crude polysaccharides isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish on production of TNF- α by murine peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages ($2.5 \times 10^6/\text{mL}$) were treated with various concentrations of hot water extracts [broccoli (BRHW-0), red cabbage (RCHW-0), brussels sprout (BSHW-0), radish (RAHW-0)] and crude polysaccharides [broccoli (BRWP-0), red cabbage (RCWP-0), brussels sprout (BSWP-0), radish (RAWP-0)] in 96-well plate for 24h. The concentrations of TNF- α in the medium were determined by ELISA kits. A total of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lipopolysaccharide (LPS) and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CVT-100 were used as the PC (positive control) and only media was used as the NC (negative control). Bars with lower case letters (a-b) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

○ 위의 결과로부터 알콜 추출 시료 [브로콜리 (BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추 (RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추 (BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무 (RAEE-C)]에 대한 항암활성 평가 스크리닝 결과를 종합해보면, 정상세포 macrophage 에 대해서는 모든 시료에서 독성을 나타내지 않았음.

○ Mouse 및 human 유래 대장암 종양세포주 [Colon26-M3.1(mouse), HT29(human), SW620(human) cell line]의 세포 독성 측정 결과, mouse 유래 Colon26-M3.1 종양세포 주에서는 방울양배추 (BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2) 시료가 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서

약 30%의 암세포 사멸을 나타냈음.

- 그러나 human 유래 HT29와 SW620 종양세포주에서는 브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2) 시료가 200 µg/mL이상의 저농도에서부터 암세포 사멸이 나타나 가장 우수한 항암활성을 나타내었음.
- Mouse 및 human 유래 폐암 종양세포주[B16BL6(mouse), A549(human), NCI-H460(human) cell line]의 세포 독성 측정 결과, 모든 폐암 종양세포주에서 브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2) 시료가 mouse 유래 B16BL6 종양세포주 경우에는 1,000 µg/mL의 농도에서 약 50%, human 유래 A549와 NCI-H460 종양세포주 경우에는 10,000 µg/mL의 농도에서 각각 약 30%, 80%의 암세포 사멸을 나타내면서 가장 우수한 항암활성을 가진다는 것을 재차 확인할 수 있었음.
- 그러나 대식세포에 대한 cytokine 생성능 측정 결과 알콜 추출 시료[브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)]에서는 4 종의 시료 모두 PEF 처리와 관계없이 cytokine을 유도하지 않았음.
- 따라서 PEF 처리에 따른 항암활성은 크게 달라지지 않았지만 다른 알콜 추출 시료[적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)]보다 브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2) 시료가 항암활성이 가장 우수하다는 것을 최종적으로 확인함.

다. PEF 처리된 십자화과 식물 유래 시료의 in vitro 상에서 면역활성 평가 스크리닝

(1) 십자화과 식물 유래 시료의 항보체 활성화

- 인체의 초기 감염 방어에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 보체계에 대하여 십자화과 식물 브로콜리, 적양배추, 방울양배추, 무로 분리된 단순 열수추출 시료[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울 양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]와 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울 양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)], 총 8종 시료의 활성화 여부를 측정하기 위해 Mayer의 방법에 따라 항보체 활성을 측정하였음 (Fig, 18).

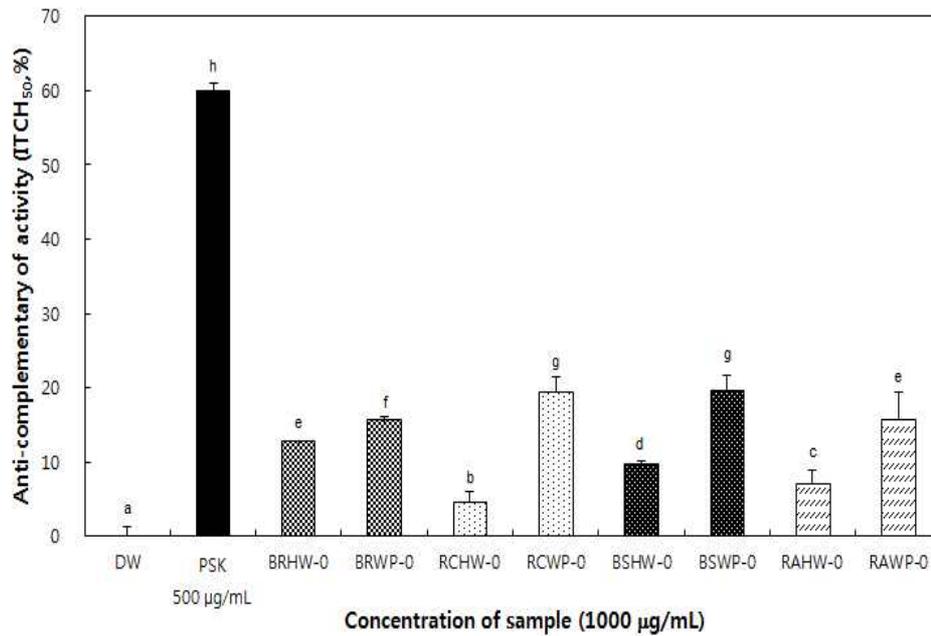


Fig 210. Anti-complementary activity of hot water extracts and crude polysaccharides isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout and radish.

¹⁾Anti-complementary activity was presented as the inhibition of 50% total complementary hemolysis by Mayer's method. ²⁾Polysaccharide-K (PSK), a known immuno-active polysaccharide from *Coriolus versicolor* was used as a positive control. ³⁾Values are the mean of triplicate±SD. Bars with lower case letters (a-h) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

- 양성대조군으로는 운지버섯(*Coriolus versicolor*) 유래 면역 활성 다당체인 PSK (polysaccharide K)를 사용하였으며 음성대조군으로써 시료를 첨가하지 않은 증류수를 이용하였으며 음성대조군에서의 활성화 정도를 ITCH₅₀ 0%로 하여 각 시료의 활성화능을 확인하였음(Fig. 18.).
- 총 8 종의 단순 열수추출 시료[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울 양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]와 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울 양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]에서 모두 1,000 µg/mL의 농도에서 500 µg/mL의 농도를 가한 양성대조군 대비 (약 60%) 상대적으로 20% 미만의 비교적 낮은 활성을 보였다.
- 그러나 단순 열수 추출 시료[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울 양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]보다는 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울 양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]에서 더 우수한 활성을 나타내었으며, 적양배추, 방울양배추, 무의 경우 단순 열수 추출 시료[적양배추(RCHW-0), 방울 양배

추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]보다 조다당 시료[적양배추(RCWP-0), 방울 양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]에서의 활성이 약 2배 이상 높았음.

(2) Mouse 유래 정상세포 murine peritoneal macrophage의 세포 독성 측정

- 인체에 병원체가 침입했을 때 가장 먼저 대응하는 세포들은 neutrophil(호중구), monocyte(단핵구) 및 macrophage(대식세포)와 같은 탐식세포(phagocytes)들로 이들은, 선천 면역반응의 주요 세포군을 형성하고 있음.
- 이 중에서 대식세포는 호중구와 함께 상피세포 장벽 이후의 생체방어에 있어 최초 대응세포로 계통 발생학적으로 모든 동물류에서 관찰됨. 또한, 항원제시세포(antigen presenting cell)로서의 기능도 수행하는데 후천적 면역반응을 조절하는 T-lymphocyte와 반응하여 이후의 면역반응에도 영향을 주게 됨.
- 십자화과 식물 유래 시료{단순열수 추출[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)], 조다당[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]}는 mouse의 복강으로부터 분리한 macrophage에 대한 직접 독성 여부를 측정하였음.
- 2×10^6 cells/mL로 조정된 세포주에 위에 명시된 시료들을 1.6 ~ 1000 μ g/mL까지의 다양한 농도로 가하여 배양한 후 세포의 생존여부를 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 19에 나타난 바와 같이 단순열수 추출[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]과 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]에서 모두 정상세포 macrophage에 대해 세포 독성을 나타내지 않았음.

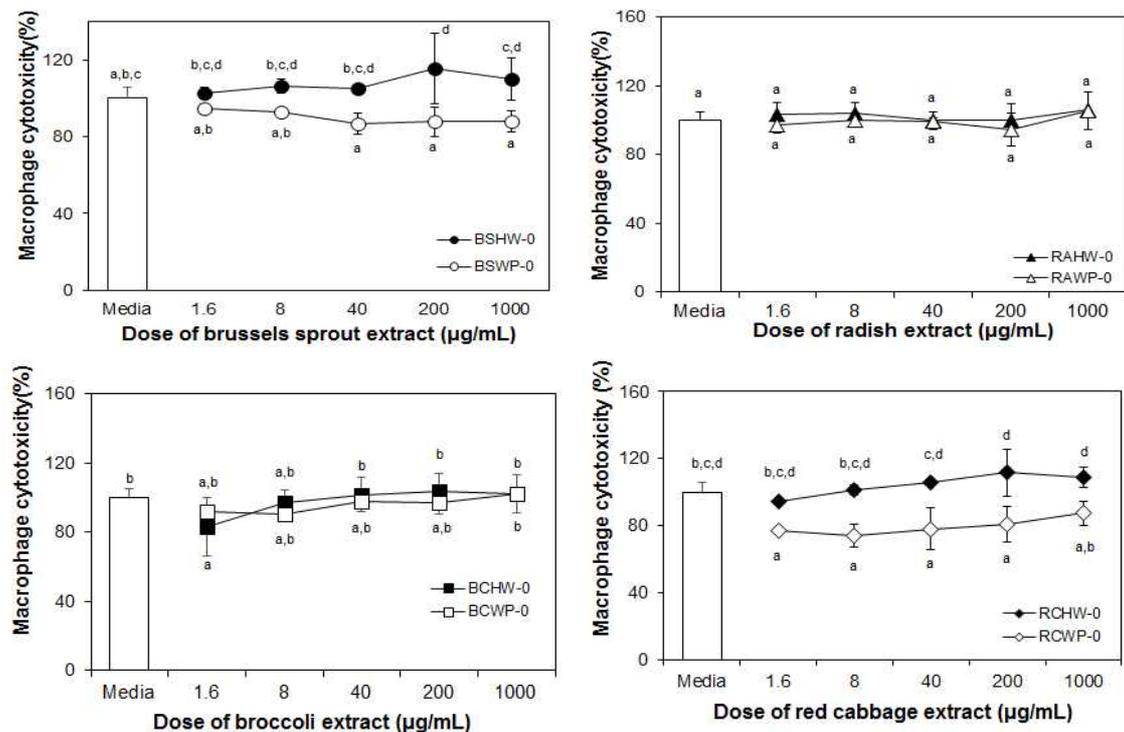


Fig 211. Cytotoxic effect of hot water extracts and crude polysaccharides isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish on murine peritoneal macrophage cells *in vitro*. Bars with lower case letters (a-d) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

(3) Mouse 유래 종양세포에 대한 세포 독성 측정

○ Mouse 유래 대장암 종양세포주인 Colon26-M3.1 carcinoma cell line과 폐암 종양세포주인 B16BL6 melanoma cell line을 이용하여 단순 열수추출 시료[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]와 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]의 암세포에 대한 직접적인 독성측정 실험을 수행하였음.

○ 1×10^5 cells/mL로 조정된 세포주에 위에 명시된 시료들을 1.6 ~ 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 까지의 다양한 농도로 가하여 2 일간 배양한 후 세포의 생존여부를 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 20에 나타난 바와 같이 mouse 유래 Colon26-M3.1 colon cancer cell line의 경우, 단순 열수추출 시료[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]와 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)] 1.6 ~ 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 모든 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았음.

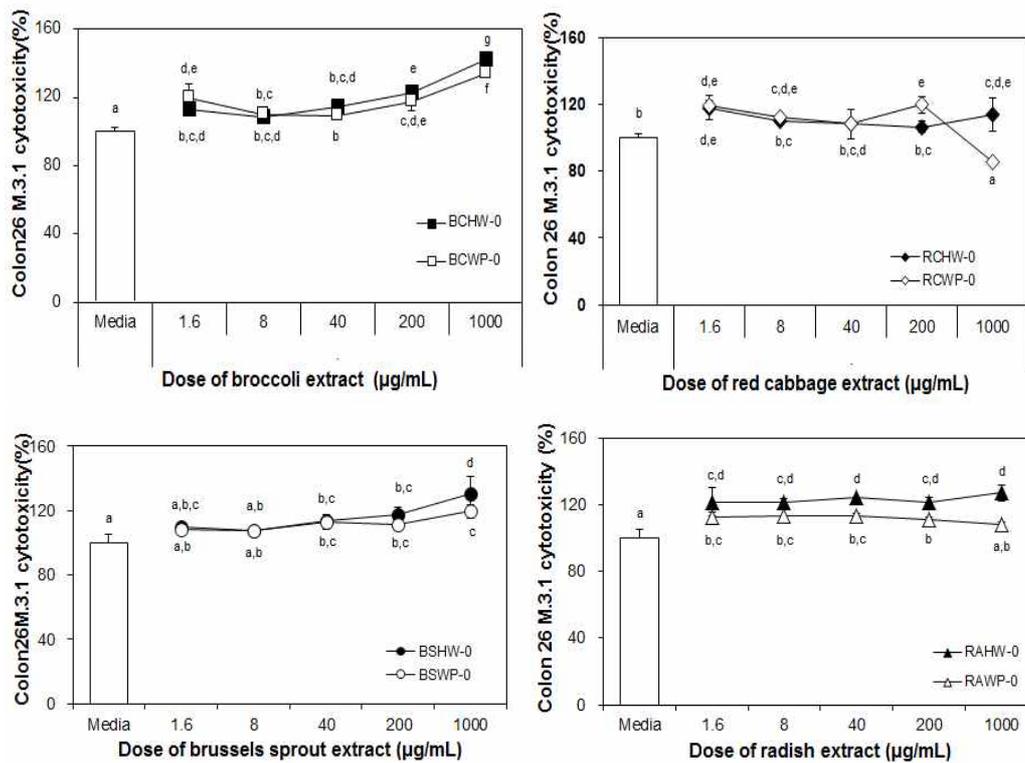


Fig 212. Cytotoxic effect of hot water extracts and crude polysaccharides isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish on Colon26-M3.1 carcinoma cell lines *in vitro*. Bars with lower case letters (a-d) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

○ Mouse 유래 B16BL6 lung cancer cell line의 경우에도 마찬가지로 단순 열수추출 시료 [브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]와 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)] 1.6 ~ 1,000 µg/mL의 모든 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았음(Fig. 21).

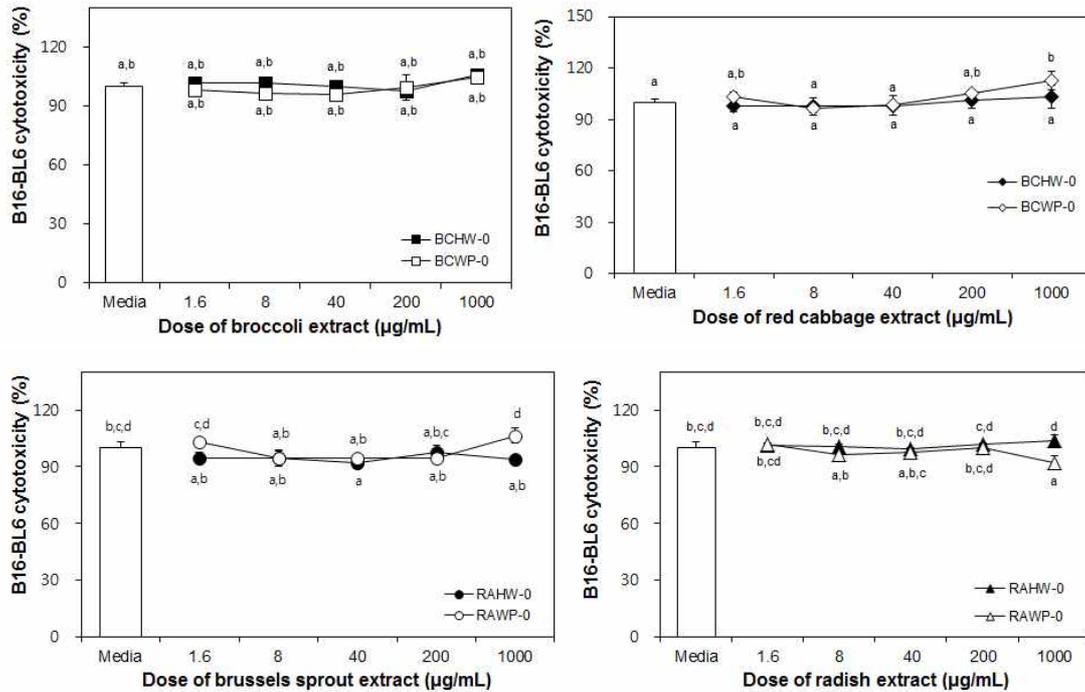


Fig 213. Cytotoxic effect of hot water extracts and crude polysaccharides isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish on B16BL6 melanoma cell lines *in vitro*. Bars with lower case letters (a-d) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

(4) 십자화과 식물 유래 시료의 림프구 증식 활성(Splenic lymphocyte proliferation)

- 비장(spleen)은 혈액으로부터 항원을 수집하여, B 및 T 림프구의 성숙과 항원에 의해 자극받은 후 림프구의 분화가 이루어지는 주요 림프기관으로 비장 내 림프구의 증식은 면역시스템에 있어 매우 중요한 의미를 갖음.
- BALB/c mouse의 비장에서부터 획득한 림프세포에 단순 열수추출 시료[브로콜리 (BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]와 조다당 시료 [브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]를 가하여 그 증식 정도를 측정된 결과(Fig. 22), 무첨가 대조군의 림프구의 증식정도를 100% 라 할 때 적양배추 조다당 시료(RCWP-0)의 경우 180% 정도의 증식 활성을 나타낸 반면, RCWP-0를 제외한 모든 시료에서는 유효한 증식 활성을 나타내지 않았음.
- 이러한 결과는 적양배추 조다당 시료 RCWP-0가 성숙된 면역세포를 직접 증식시키는 mitogen 활성이 있음을 보여주는 것으로 따라서 RCWP-0의 투여가 외부로부터 항원에 노출 시, 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 작동세포의 수를 증가시킴으로써 항원에 대한 효과적인 방어 효과를 유도할 수 있을 것으로 사료되었음.

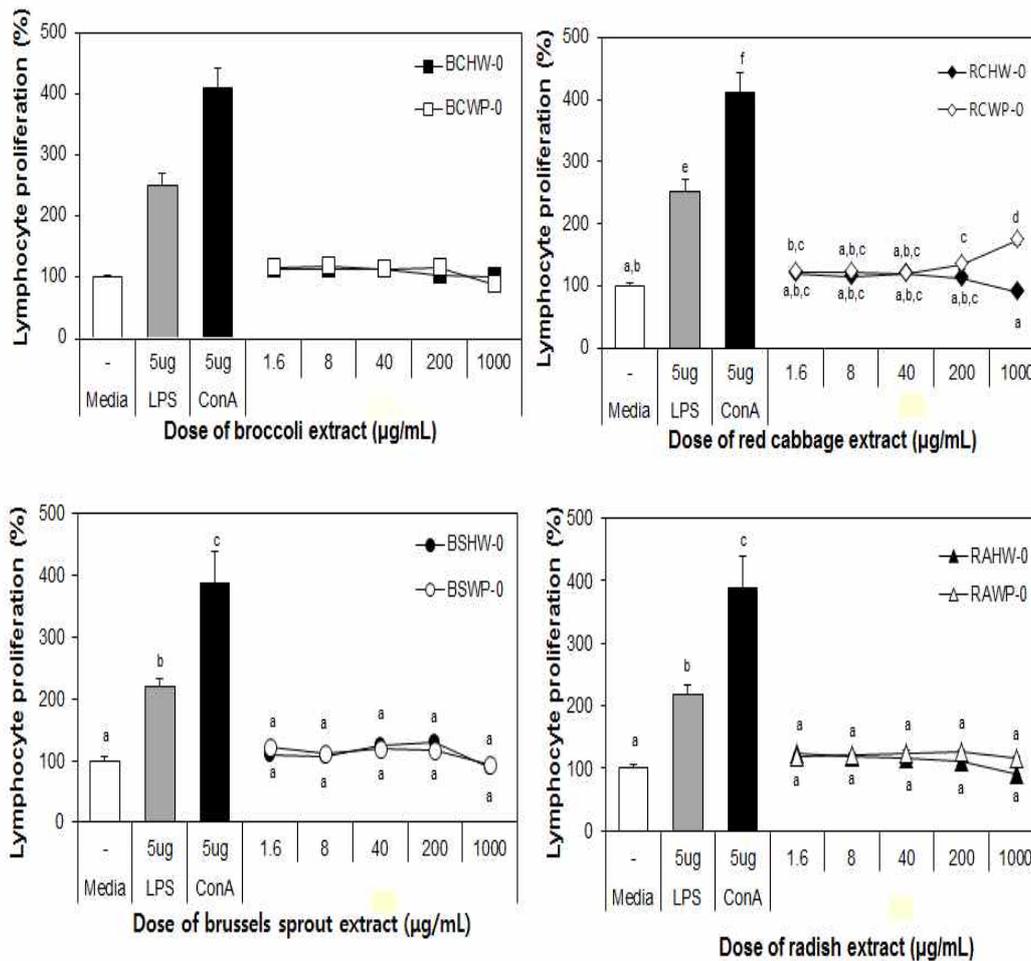


Fig 214. Lymphocyte proliferation activity of hot water extracts and crude polysaccharides isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish. Bars with lower case letters (a-f) indicate significant differences ($P<0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

(5) 십자화과 식물 유래 시료가 대식세포(macrophage)의 cytokine 생산에 미치는 영향

○ Macrophage는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 cytokine을 분비하여 면역현상을 조절하며, 항원에 대한 면역작용의 증추적인 역할을 하는 세포로서, 항원제시와 림프구의 비특이적 면역작용에 관계하며, 종양세포에 대해서는 직접적인 상해활성을 나타냄. 또한 TLR(tool-like receptor)에 반응하는 물질(LPS 혹은 천연물)은

macrophage를 활성화하여 T세포와 B 세포의 증식, 식균 작용을 위한 대식세포의 활성화, 미생물 감염에 대한 방어 등의 2차 면역반응을 조절할 수 있는 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF- α 와 같은 cytokine을 생산한다고 알려져 있음.

- IL-1, IL-6 및 TNF- α 는 macrophage에 의해 유도되는 대표적인 cytokine 으로 세균감염에 따른 염증반응에 있어서 중추적인 역할을 하며 염증병소에서 그 양이 증가되는 것으로 알려져 있음. IL-6는 IL-1과 협동적으로 작용하여 T 세포와 B 세포의 분화에 관여하고 항암효과가 있다고 보고되었으며, TNF- α 은 특정암세포에 대한 세포독성과 항바이러스성 작용이 있고, 급성 및 만성 염증질환에서 일어나는 여러 가지 생체반응에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있음.
- 한편, IL-12는 NK cell의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응을 유도하는 cytokine으로써 암세포와 같은 세포성 외래물질에 대한 반응성을 높이는 작용을 한다고 알려져 있음. 또한 IL-10은 macrophage에 의한 TNF, IL-1, chemokine 및 IL-12의 생성을 교차조절(cross-regulation)함으로써 T 림프구 활성화에 있어 대식세포의 부수적 기능(T 림프구 매개성 특이면역염증반응)을 저해한다고 알려져 있음.
- 단순 열수추출 시료[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]와 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]의 직접적인 자극에 의한 macrophage의 cytokine 생산을 *in vitro*에서 측정된 결과는 아래와 같음.
- IL-6, IL-12의 경우 단순 열수추출 시료[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]에서는 cytokine의 생산능이 거의 나타나지 않았으며 (Fig. 23 및 Fig. 24), TNF- α 의 경우 브로콜리 단순 열수추출 시료 BRHW-0와 방울양배추 단순 열수추출 시료 BSHW-0가 1,000 μ g/mL에서 높은 cytokine의 생성 유도능을 촉진하였음(Fig. 25).
- IL-6의 경우(Fig. 23), 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 무(RAWP-0)] 모두 8 μ g/mL 저농도 이상의 농도에서부터 cytokine의 생산량이 급격히 높아졌으며, 특히 적양배추 조다당 시료 RCWP-0의 경우에는 8 μ g/mL 저농도에서도 positive control 대비 약 85% 정도에 해당하는 높은 cytokine 생산량을 나타냄. 또한, 방울양배추 조다당 시료 BSWP-0는 40 μ g/mL 농도 이상에서 cytokine의 생성 유도능을 증가하였음.
- 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울양배추(BSHW-0), 무(RAWP-0)] 모두 1000 μ g/mL의 고농도에서 positive control 대비 약 80% 이상의 cytokine 생산량을 보여주었지만, 브로콜리 조다당 시료 BRWP-0가 40 μ g/mL 저농도 이상에서, 적양배추 조다당 시료 RCWP-0가 8 μ g/mL 저농도 이상에서 IL-6 생산량을

증가시켜 가장 우수한 생산능을 보여주었음.

- IL-12의 경우(Fig. 24), 무 조다당 시료 RAWP-0는 40 µg/mL 농도 이상에서부터 농도 의존적으로 생산능을 나타내는 반면, 브로콜리 조다당 시료 BRWP-0는 40 µg/mL, 적양배추 조다당 시료 RCWP-0 8~40 µg/mL, 방울양배추 조다당 시료 BSHW-0 200 µg/mL 농도에서 가장 높은 생산능을 나타내다가 오히려 그 이상의 농도에서는 생산량이 소폭 감소하는 경향을 보였음.
- 이는 브로콜리 조다당 시료 BRWP-0는 40 µg/mL, 적양배추 조다당 시료 RCWP-0 8 µg/mL, 방울양배추 조다당 시료 BSHW-0 200 µg/mL, 무 조다당 시료 RAWP-0는 200 µg/mL 농도 이상에서 NK cell의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응 유도를 통한 cytotoxic T lymphocyte(CTL)의 활성화와 같은 세포매개성 면역에 있어 활성을 갖으리라 예상되며, 그 최적 농도 조건일 것이라 추측되는 결과였음.
- IL-12는 암세포 존재 시, 암세포 치사작용을 하는 NK cell 활성화에 직접 관여하므로 항암 활성 유도에 필수적인 cytokine으로 인정되고 있으므로, 특히 브로콜리 조다당 시료 BRWP-0와 적양배추 조다당 시료 RCWP-0가 암세포에도 효율적으로 작용할 가능성이 있는 것으로 기대되었음.
- TNF-α의 경우(Fig. 25), 무 조다당 시료 RAWP-0는 200 µg/mL, 방울양배추 조다당 시료 BSWP-0 40 µg/mL, 브로콜리 조다당 시료 BRWP-0와 적양배추 조다당 시료 RCWP-0 8 µg/mL 농도 이상에서부터 positive control에 준하는 활성을 나타내었음.
- 위의 단순 열수추출 시료[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]와 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]의 IL-6, IL-12 및 TNF-α cytokine들의 생성능 결과를 종합해보면, 단순 열수추출 시료[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]에서는 TNF-α에서만 브로콜리 단순 열수추출 시료 BRHW-0, 방울양배추 단순 열수추출 시료 BSHW-0, 무 단순 열수추출 시료 RAHW-0가 1,000 µg/mL의 고농도에서 TNF-α의 생산을 유도하였으며, 적양배추 단순 열수추출 시료 RCHW-0는 IL-6, IL-12 및 TNF-α cytokine 생산을 모두 유도하지 않았음.
- 반면, 브로콜리 조다당 시료 BRWP-0는 40 µg/mL, 적양배추 조다당 시료 RCWP-0 8 µg/mL, 방울양배추 조다당 시료 BSHW-0 200 µg/mL, 무 조다당 시료 RAWP-0는 200 µg/mL 농도 이상에서 우수한 IL-6, IL-12 및 TNF-α 모든 cytokine들의 생산 유도능을 나타내었고, 이 중 적양배추 조다당 시료 RCWP-0이 가장 우수하다고 최종적으로 확인할 수 있었음.

○ 앞선 결과를 종합해보면 대식세포 자극 활성화에 가장 우수한 시료는 단순 열수추출 시료보다는 조다당 시료에서 우수한 대식세포 자극 활성을 나타내었고, 특히 적양배추 조다당 시료 RCWP-0와 브로콜리 조다당 시료 BRWP-0가 유사하게 저농도에서 높은 활성을 나타내었으나 적양배추 조다당 시료 RCWP-0가 좀 더 높은 활성을 나타낸다는 것을 확인 할 수 있었음.

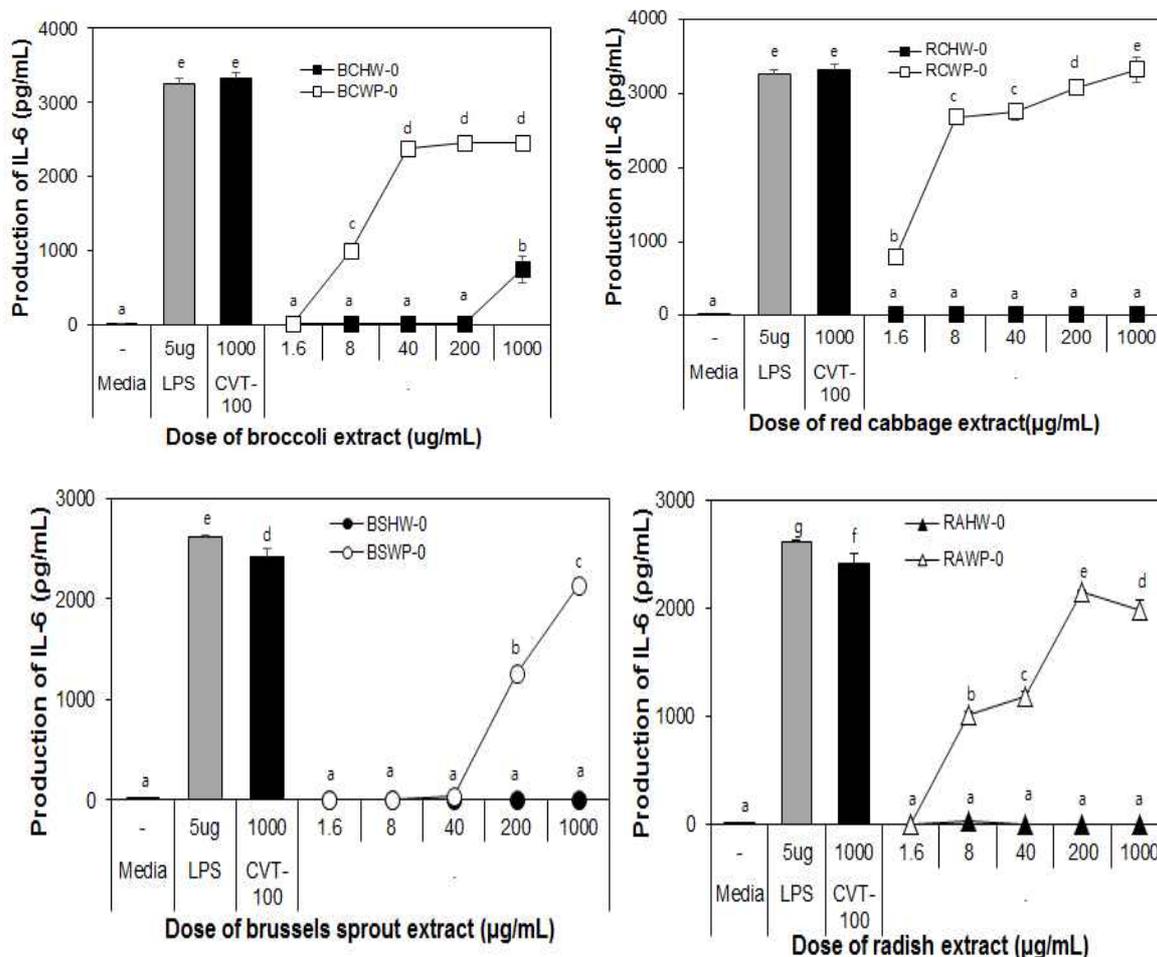


Fig 215. Effect of hot water extracts and crude polysaccharides isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish on production of IL-6 by murine peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages ($2.5 \times 10^6/\text{mL}$) were treated with various concentrations of hot water extracts [broccoli (BRHW-0), red cabbage (RCHW-0), brussels sprout (BSHW-0), radish (RAHW-0)] and crude polysaccharides [broccoli (BRWP-0), red cabbage (RCWP-0), brussels sprout (BSWP-0), radish (RAWP-0)] in 96-well plate for 24h. The concentrations of IL-6 in the medium were determined by ELISA kits. A total of 5 $\mu\text{g/mL}$ lipopolysaccharide (LPS) and 1000 $\mu\text{g/mL}$ CVT-100 were used as the PC (positive control) and only media was used as the NC (negative control). Bars with lower case letters (a-g) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

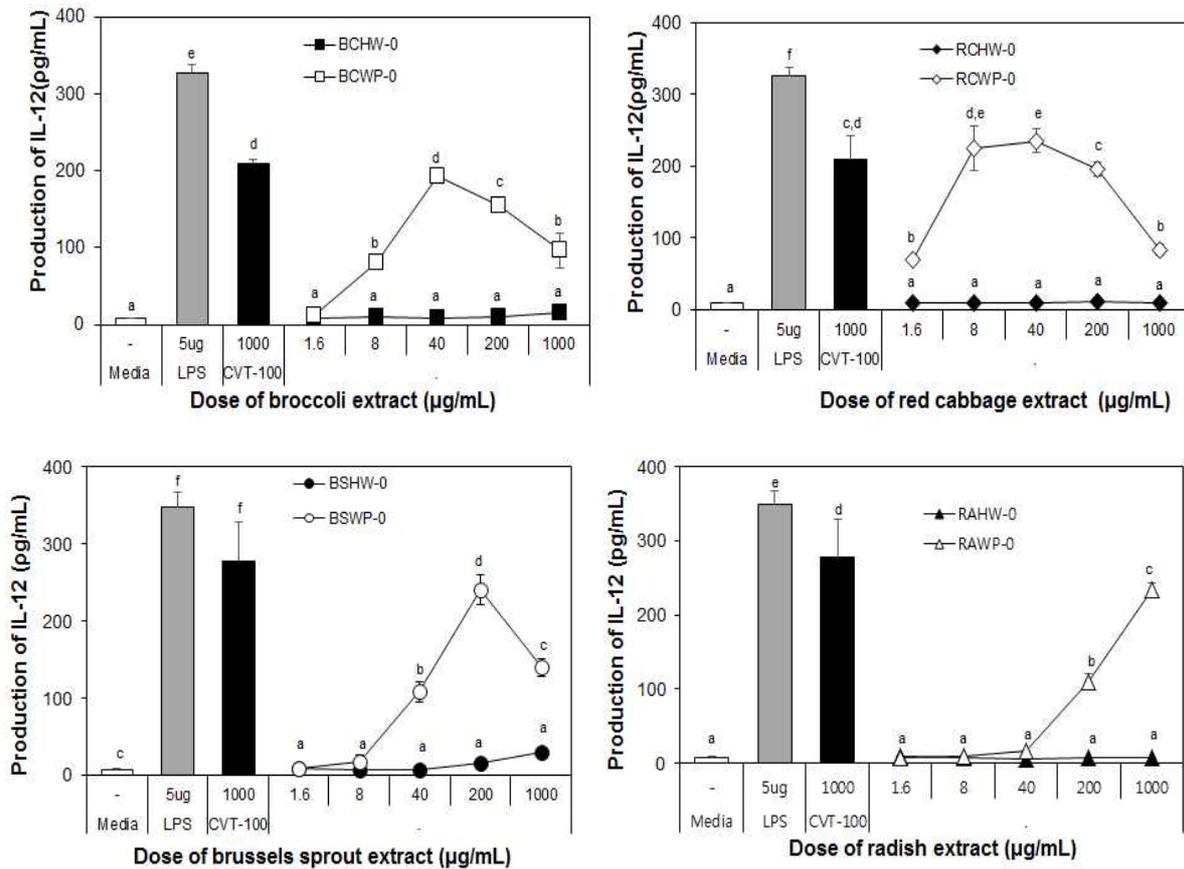


Fig 216. Effect of hot water extracts and crude polysaccharides isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish on production of IL-12 by murine peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages ($2.5 \times 10^6/\text{mL}$) were treated with various concentrations of hot water extracts [broccoli (BRHW-0), red cabbage (RCHW-0), brussels sprout (BSHW-0), radish (RAHW-0)] and crude polysaccharides [broccoli (BRWP-0), red cabbage (RCWP-0), brussels sprout (BSWP-0), radish (RAWP-0)] in 96-well plate for 24h. The concentrations of IL-12 in the medium were determined by ELISA kits. A total of 5 µg/mL lipopolysaccharide (LPS) and 1000 µg/mL CVT-100 were used as the PC (positive control) and only media was used as the NC (negative control). Bars with lower case letters (a-f) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

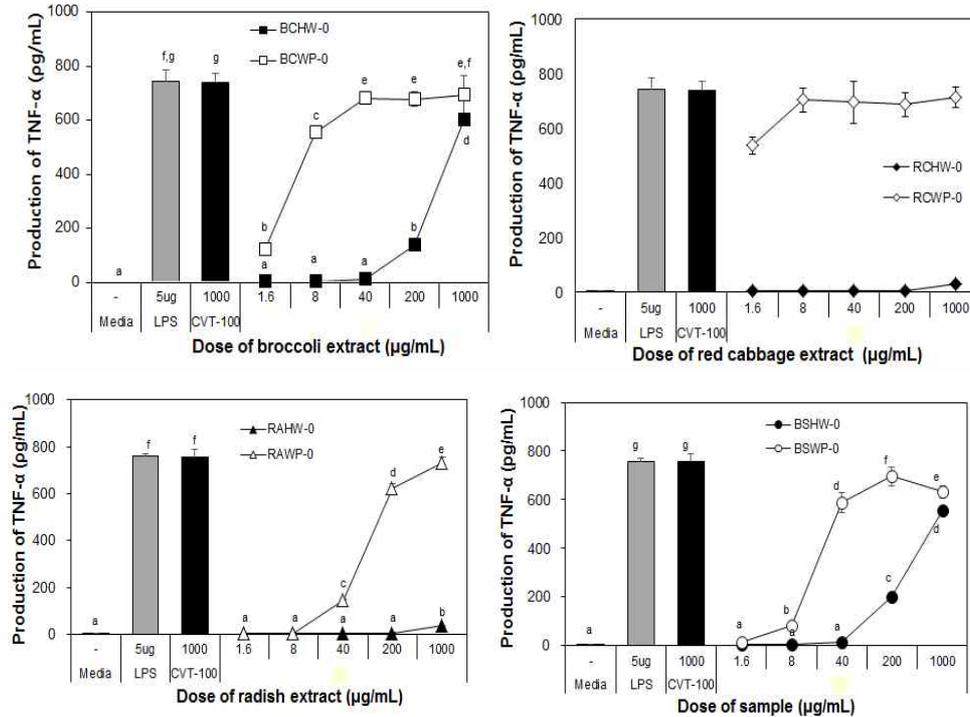


Fig 217. Effect of hot water extracts and crude polysaccharides isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish on production of TNF- α by murine peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages (2.5×10^6 /mL) were treated with various concentrations of hot water extracts [broccoli (BRHW-0), red cabbage (RCHW-0), brussels sprout (BSHW-0), radish (RAHW-0)] and crude polysaccharides [broccoli (BRWP-0), red cabbage (RCWP-0), brussels sprout (BSWP-0), radish (RAWP-0)] in 96-well plate for 24h. The concentrations of TNF- α in the medium were determined by ELISA kits. A total of 5 μ g/mL lipopolysaccharide (LPS) and 1000 μ g/mL CVT-100 were used as the PC (positive control) and only media was used as the NC (negative control). Bars with lower case letters (a-g) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

(6) 십자화과 식물 유래 시료의 장관면역계에 대한 활성

(가) Peyer's patch cell에 의한 cytokine 생산 자극 활성 및 이를 통한 골수세포 증식 활성

○ Peyer's patch는 T 세포와 B 세포 등으로 구성되어 있고 T세포는 macrophage와 함께 작용하여 다양한 cytokine을 생산하게 되는데, 이중 골수의 증식에 관여를 하는 IL-6, GM-CSF 등과 같은 cytokine에 의해 전신면역으로 확대가 일어나게 됨. 이를 확인하기 위하여 시료에 의한 Peyer's patch cell에서의 cytokine의 생성량과 Peyer's patch cell 배양 상등액을 mouse bone marrow에 적용하여 골수세포의 proliferation에 미치

는 영향을 확인하고자 하였음(Fig. 26 참조).

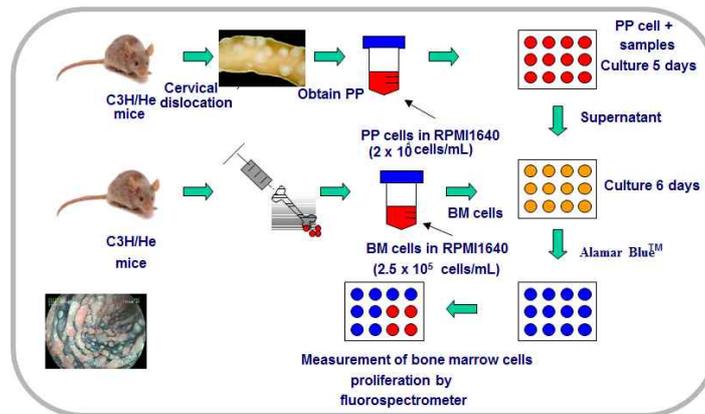


Fig 218. Assay for intestinal immune system modulating activity by measurement of bone marrow cell proliferation.

- 단순 열수추출 시료[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]와 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]를 Peyer's patch cell에 처리하고 이들이 생산한 GM-CSF의 함량을 ELISA로 측정, 단순 열수추출 시료[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]의 경우 네 시료 모두 GM-CSF의 생산에는 어떠한 영향도 미치지 않는 결과를 보였음.
- 이와 반대로, 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]에서는 적양배추 조다당 시료 RCWP-0만이 1,000 µg/mL의 농도에서 positive control 대비 약 80%의 GM-CSF 생산 유도능을 촉진시켰음. 이는 적양배추 조다당 시료 RCWP-0가 골수 증식에 관여하는 GM-CSF cytokine 생산을 촉진시킴으로써 전신면역에 공헌할 것이라 확인할 수 있었음(Fig. 27).

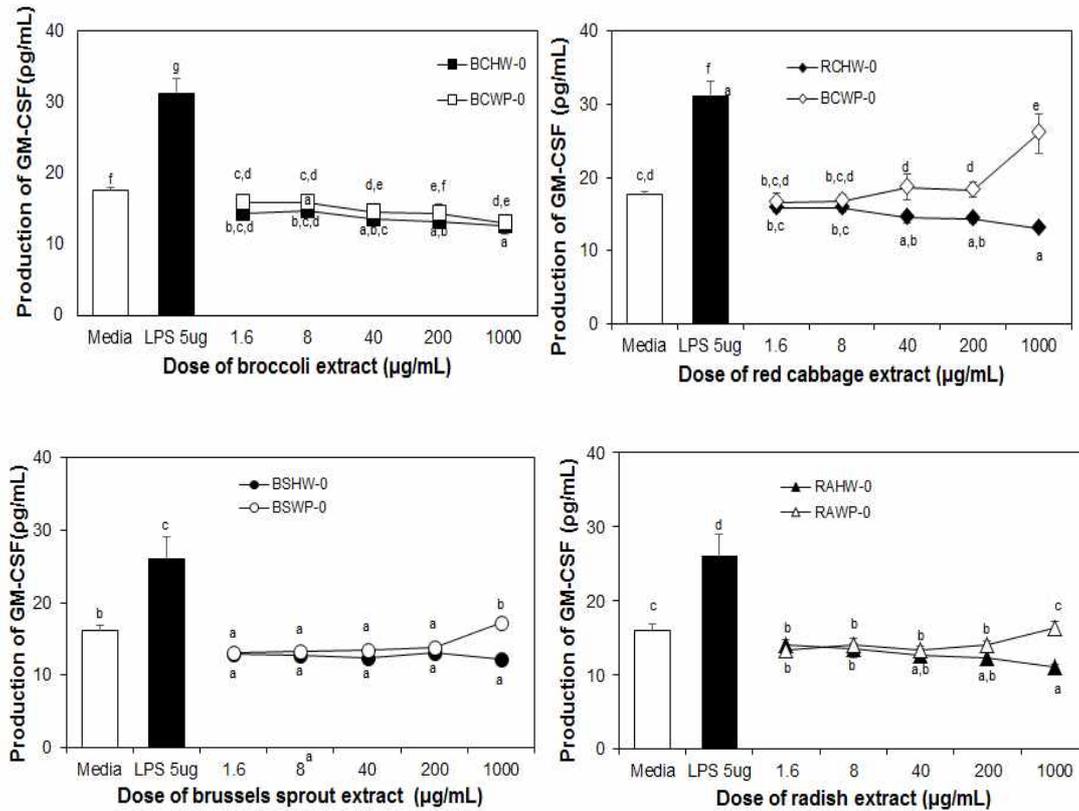


Fig 219. Effect of hot water extracts and crude polysaccharides isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish on production of GM-CSF by Peyer's patch cells. Peyer's patch cells ($3.2 \times 10^6/\text{mL}$) were treated with hot water extracts [broccoli (BRHW-0), red cabbage (RCHW-0), brussels sprout (BSHW-0), radish (RAHW-0)] and crude polysaccharides [broccoli (BRWP-0), red cabbage (RCWP-0), brussels sprout (BSWP-0), radish (RAWP-0)] in 96 well plate for 12 h. The concentration of cytokine in the medium was determined by ELISA kits. NC and PC mean negative and positive control, respectively. Bars with lower case letters (a-g) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

○ 한편, 단순 열수추출 시료 [브로콜리 (BRHW-0), 적양배추 (RCHW-0), 방울양배추 (BSHW-0), 무 (RAHW-0)]와 조다당 시료 [브로콜리 (BRWP-0), 적양배추 (RCWP-0), 방울양배추 (BSWP-0), 무 (RAWP-0)]의 Peyer's patch를 경유한 골수세포 증식활성을 검토한 결과, 단순 열수추출 시료 [브로콜리 (BRHW-0), 적양배추 (RCHW-0), 방울양배추 (BSHW-0), 무 (RAHW-0)]에서는 골수세포 증식능을 나타내지 않은 반면, 조다당 시료 [브로콜리 (BRWP-0), 적양배추 (RCWP-0), 방울양배추 (BSWP-0), 무 (RAWP-0)]에서는 네 시료 모두 무첨가군에 비해 1,000 µg/mL의 농도에서 골수세포 증식활성을 보여주었음.

○ 특히, 적양배추 조다당 시료 RCWP-0의 경우 1,000 µg/mL에서 양성 대조군보다 높은

활성을 나타내어 가장 우수한 골수세포 증식활성을 보였음(Fig. 28).

- 이는 앞선 대식세포의 자극 활성 결과와 동일한 결과로써 단순 열수추출 시료보다는 조다당 시료에서 우수한 장관면역계 자극 활성을 나타내었고, 특히 적양배추 조다당 시료 RCWP-0가 가장 우수한 활성을 나타낸다는 것을 재차 확인할 수 있는 결과였음.

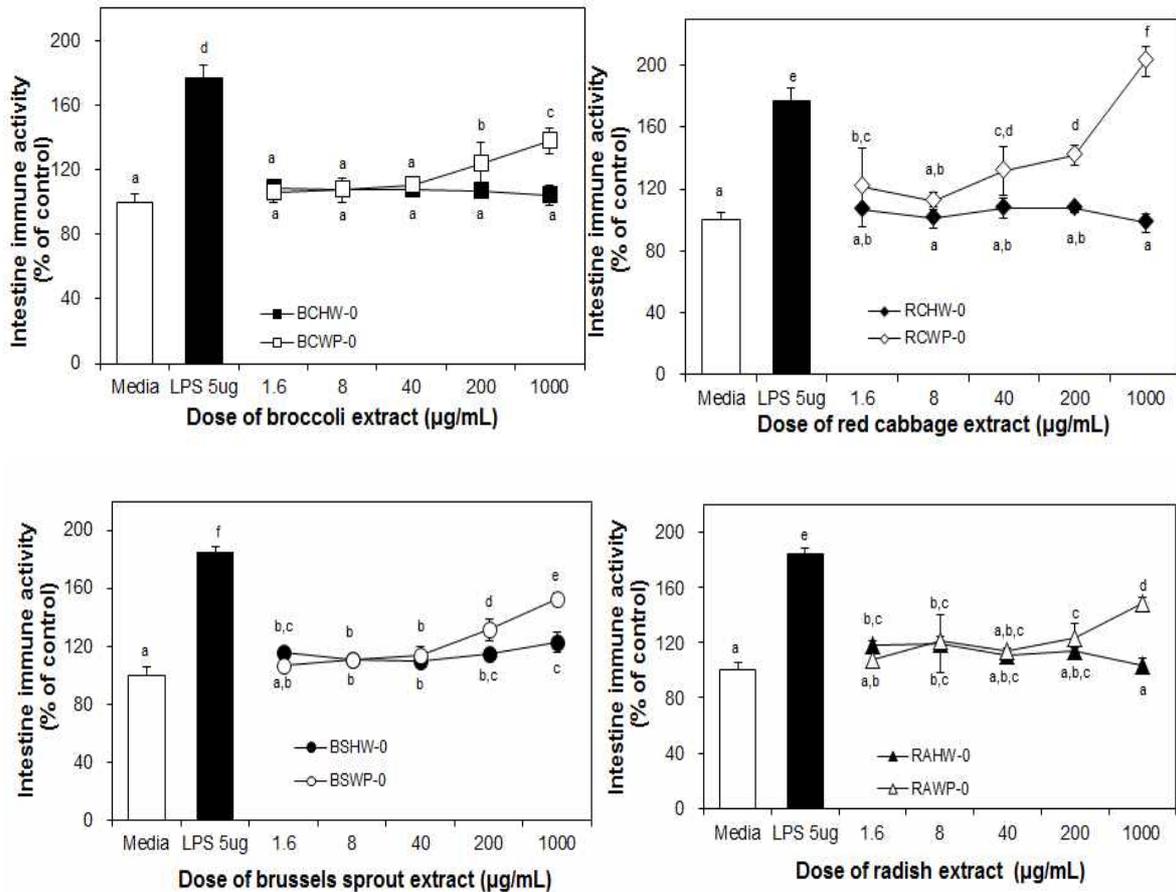


Fig 220. Effect of hot water extracts and crude polysaccharides isolated from broccoli, red cabbage, brussels sprout, radish on bone marrow proliferation activity through Peyer's patch cells. A 5 µg/mL of lipopolysaccharide (LPS) was used as the PC (positive control) and only media was used as the NC (negative control). Bars with lower case letters (a-f) indicate significant differences ($P < 0.05$) as shown by Duncan's multiple range tests.

- 위의 모든 결과를 종합해보면 원재료와 PEF 처리 십자화과 식물 4 종(브로콜리, 적양배추, 방울양배추, 무)의 면역 및 항암활성을 비교, 평가하여 고효성 식물을 선별하기 위해 알콜 추출법, 단순 열수추출법 및 다당 추출법으로 시료 총 18 종을 조제함.

- 알콜 추출 시료[브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)]의 경우, mouse 및 human 유래 종양세포주에 의한 암세포 독성 측정 실험을 진행함으로써 시료의 항암활성능을 측정함.
- 단순 열수추출 시료[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울 양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]와 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울 양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]의 경우, 대식세포에 의한 면역자극 활성화와 Peyer's patch에 의한 전신면역계 자극 활성화 및 골수세포 증식능을 측정함으로써 시료의 면역활성능을 평가함.
- 단순 열수 추출 시료[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울 양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]와 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울 양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]를 조제할 시, 브로콜리 단순 열수 추출 BRHW-0와 브로콜리 조다당 BRWP-0의 수율이 각각 1.21%, 2.15%로 가장 높은 수율을 나타냄.
- 알콜추출 시료[브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2), 적양배추(RCEE-C, RCEE-P1, RCEE-P2), 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2), 무(RAEE-C)]의 경우 mouse 및 human 유래 폐암과 대장암 세포주에 대한 직접적인 독성실험을 측정한 결과 모든 독성 실험에서 PEF를 처리하지 않은 군과 처리한 군은 큰 활성 차이를 나타내지 않았으나, 브로콜리(BREE-C, BREE-P1, BREE-P2)와 방울 양배추(BSEE-C, BSEE-P1, BSEE-P2) 알콜 추출 시료가 1,000 µg/mL 농도 이상에서 암세포 사멸을 나타내어 두 PEF 처리 십자화과 식물이 항암활성에 우수할 것으로 사료됨.
- 단순 열수추출 시료[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울 양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)]와 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울 양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]의 경우에는 대식세포 자극 활성화, 장관면역계 활성화에 대한 실험을 진행한 결과, 단순 열수추출 시료[브로콜리(BRHW-0), 적양배추(RCHW-0), 방울 양배추(BSHW-0), 무(RAHW-0)] 모두 활성이 거의 나타나지 않음.
- 반면, 십자화과 식물 유래 조다당 시료[브로콜리(BRWP-0), 적양배추(RCWP-0), 방울 양배추(BSWP-0), 무(RAWP-0)]의 경우에는 적양배추 조다당 RCWP-0가 8 µg/mL, 브로콜리 조다당 BRWP-0가 40 µg/mL 저농도에서 가장 우수한 대식세포 자극 활성을 나타내고, 장관면역계 활성화에서도 우수한 골수세포 증식활성을 나타내 전신면역에 공헌한다고 최종 확인되었음.
- 모든 결과를 종합해 볼 때, 수율면에서는 브로콜리가 가장 높았으며, 항암 활성 평가에서는 브로콜리와 방울 양배추가, 면역 활성화 평가에서는 적양배추와 브로콜리가 높이

평가되어 최종적으로 수율과 면역활성을 모두 고려하였을 때 브로콜리 시료가 추후 실험을 진행하기에 가장 적합할 것으로 사료되어 최종적으로 선택함.

라. 브로콜리로부터 분리한 다당의 면역활성 및 항암활성 평가

- 1차년도에 고면역활성 식물 선별을 위한 연구에서 최종 선택되어진 브로콜리를 이용하여 *in vitro* 및 *in vivo*에 대한 면역활성 평가 및 신호 전달 메카니즘, 그리고 면역활성 및 항암활성 본체에 대한 구조적 규명을 진행하기로 함.

(1) 조다당 시료의 분리 및 정제

(가) 시료의 탈색 및 전처리

- 앞서 PEF 처리 후 남은 브로콜리 잔사로부터 분리한 조다당의 면역활성이 우수하다는 것을 *in vitro* 상에서 확인하였으므로 이를 바탕으로 면역활성을 보다 높이고자 시판 상업용 pectinase 효소처리를 진행하기로 함.
- PEF 처리를 행한 제주산 브로콜리의 가식부 부분만을 회수하여 블라인더를 이용하여 마쇄한 후, 2 배의 물을 첨가하여 방치한 후, 여기에 다시 8 배의 에탄올을 첨가하여 2시간 동안 방치하여 브로콜리 고유의 녹색 색소인 클로로필을 제거하였음. 이 후, 남은 잔사는 완전 건조하여 조다당을 분리하기 위해 사용되었음.

(나) 효소처리를 이용한 조다당의 추출

- PEF 처리 후 남은 브로콜리 잔사로부터 다당을 분리하기 위하여 브로콜리 분말 300 g에 DIW 3 L에 현탁하고 100℃에서 가열 처리하여 최초부피의 절반이 될 때까지 열수 추출을 진행하였음.
- 추출액을 6500 rpm에서 20분간 원심 분리하여 잔사를 제거하고 여기에 식품용 상업용 pectinase 효소인 Plantase maxTM를 37℃에서 2일간 처리(원물기준 0.5~1%)하였음. 이를 6500 rpm에서 20 분간 원심 분리하여 잔사를 제거하고 여기에 4배 (v/v) 부피의 95% ethanol을 가하여 24시간 교반하면서 다당을 침전시킨 후, 이 때 발생한 침전물은 6500 rpm에서 30분간 원심 분리하여 침전물을 회수하였음.
- 이를 소량의 증류수에 용해시킨 후, dialysis tubing (MW cut-off 12,000)을 이용하여 3~4일간 투석을 실시하였으며 이를 동결 건조하여 브로콜리 효소처리 조다당 BCE-0를 얻었음(Fig. 2).

(다) 다당의 분리 및 정제

- 브로콜리로부터 pectinase 처리하여 얻어진 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0를 소량의 증류수에 녹여 50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5)로 평형화된 Sephadex G-75 column (4×120 cm)에 전개하여 GPC (Gel permeation chromatography)를 시행하였음.
- 각 분획 시료는 중성당, 산성당, 단백질 및 KDO 함량을 분석하여 용출곡선을 작성하였으며 분자량 및 구성성분이 상이한 3개의획분, BCE-I, BCE-II 및 BCE-III로 분리하였으며, 각 획분은 농축, 투석 및 동결 건조를 시행하여 분석용 정제시료로 조제하였음(Fig. 2 및 Fig. 29).
- 브로콜리 유래 정제획분 BCE-I, -II 및 -III의 수율은 각각 브로콜리 원물 대비 0.49%, 1.46% 및 0.46%로 확인되었음 (Fig. 2).

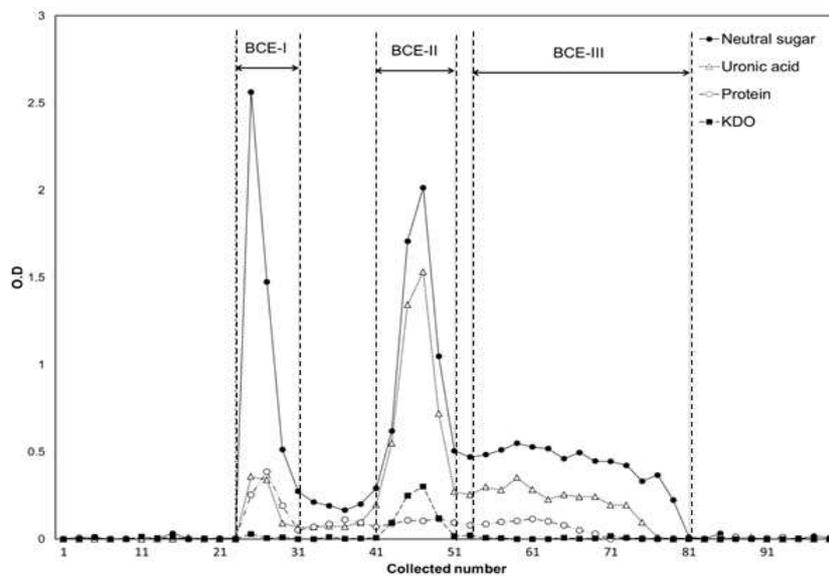


Fig 221. Gel permeation chromatography of BCE-0 on column of Sephadex G-75. BCE-0 was subjected on Sephadex G-75 column (2.5×90 cm) and eluted with 50 mM ammonium formate buffer.

- 이를 차후 실험에 진행하기 위해 십여 차례 gel filtration chromatography 반복하여 시료를 다량 확보하였음 (Fig. 30).

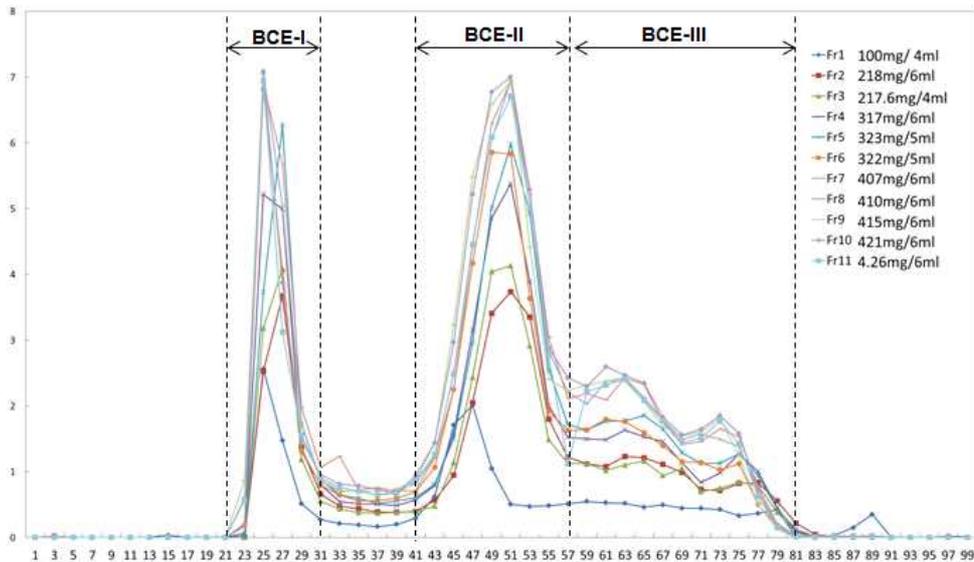


Fig 222. Overlapping elution profiles of the crude polysaccharide, BCE-0 isolated from broccoli on Sephadex G-75.

(2) 브로콜리 유래 효소처리 다당 획분의 일반화학적 특성

- 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0 및 정제다당획분 BCE-I, -II, -III의 화학적 조성 및 구성당을 분석한 결과, Table 91에 나타난 바와 같음.
- 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0의 화학적 조성을 분석한 결과, 중성당 57.7%, 산성당 34.9%, 단백질 4.7% 및 Kdo 2.75%로 확인되었으며, alditol acetate로 유도체화한 후 구성당을 분석한 결과, galactose (19.2%), rhamnose (14.4%) 및 arabinose (12.2%) 순으로 확인되었으며 2-methyl fucose, 2-methyl xylose, apiose 및 aceric acid 와 같은 pectin 유래 rhamnogalacturonan II (RG-II)에서 발견되는 특이당도 일부 검출되었음. 분자량을 확인하기 위해, HPLC를 이용하여 elution pattern을 확인한 결과 고분자 물질과 저분자 물질이 혼재된 형태로 확인되었음(Fig. 31(A)).
- 이를 통하여 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0는 중성당과 산성당이 주로 존재하였으며, 다양한 구성당과 함께 pectin 유래 RG-II 구조에서만 발견되는 Kdo 및 특이당들이 검출된 사실로 미루어 보아 산성 다당체인 pectin 계열의 다당일 것으로 추정되었음.
- 한편 브로콜리 유래 효소처리 정제다당 BCE-I의 경우, 중성당 74.3%, 산성당 18.2%, 단백질 7.2%, Kdo 0.3%로 이루어져 있었으며, phenolic compounds는 검출되지 않았음 (Table 6).

- 구성당으로는 galactose (53.5%), galacturonic acid (17.9%), arabinose (13.0%) 순으로 나타났으며, 분자량을 확인한 결과, 50 kDa 정도의 정제도가 우수한 좌우 대칭의 단일 피크로 존재한다고 확인되었음(Fig. 31(B)).
- 위 결과로부터 BCE-I은 rhamnose, arabinose 및 galactose가 주로 존재하는 것으로 보아 rhamnose 및 galacturonic acid를 주쇄로 한 pectin 유래 rhamnogalacturonan I (RG-I) 구조일 것으로 추정되며, 특히 arabinose와 galactose의 높은 조성을 고려할 때, RG-I 구조내의 arabinogalactan이 높은 비율로 존재할 것이라고 추정되었음.
- 비교적 저분자 다당체 BCE-II는 중성당 51.1%, 산성당 39.8%, 단백질 3.8%, Kdo 5.4%로 이루어져 있었으며, phenolic compounds는 검출되지 않았음 (Table 6). 구성당 분석 결과, galacturonic acid (36.9%), rhamnose (13.8%), arabinose (12.6%) 순으로 나타났으며, 자연계에서 거의 관찰되지 않으며, RG-II 구조에서만 주로 존재하는 2-methyl fucose, 2-methyl xylose, apiose 및 aceric acid 와 같은 특이당들이 다량 검출되었음.
- 또한, HPLC를 이용하여 순도 및 분자량을 측정된 결과, 9.6 kDa 의 정제도가 우수한 단일 회분을 나타냄으로써(Fig. 31(C)), BCE-II는 pectin의 homogalacturonan (HG) 부분에 공유적으로 결합되어있는 RG-II 구조임을 추정케 하였음.
- 저분자 회분 BCE-III는 중성당 56.4%, 산성당 37.5%, 단백질 5.0%, Kdo 1.1%로 이루어져 있었으며, phenolic compounds는 검출되지 않았음 (Table 6). 이중 중성당의 경우 rhamnose (26.2%), galactose (13.8%), arabinose (8.5%)로 구성되어 있었으며, 3.5 kDa 의 분자량으로 이루어져 있었으며, chromatogram를 통하여 효소 가수분해로 인해 분해된 저분자들과 RG-II의 monomer 형태가 혼재되어있을 것으로 추정하였음(Fig. 31(D)).

Table 91. Chemical properties of crude polysaccharide, BCE-0 isolated from broccoli by digests of pectinase

| Chemical composition(%) | BCE-0 | BCE-I | BCE-II | BCE-III |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Molecular weight (kDa) | - | 50 | 9.6 | 3.5 |
| Neutral sugar | 57.7±1.2 | 74.3±0.5 | 51.1±1.1 | 56.4±1.7 |
| Uronic acid | 34.9±0.3 | 18.2±1.0 | 39.8±0.5 | 37.5±0.9 |
| Kdo-liked materials | 2.7±0.5 | 0.3±0.0 | 5.4±0.2 | 1.1±0.3 |
| Protein | 4.7±0.1 | 7.2±0.0 | 3.8±0.1 | 5.0±0.1 |
| phenolic compounds | - | | | |
| Component sugar (mole%) | | | | |
| 2-Methyl fucose | 2.1±0.0 | - | 3.6±0.1 | 0.2±0.0 |
| Rhamnose | 14.4±0.1 | 4.1±0.1 | 13.8±0.1 | 26.2±0.0 |
| Fucose | 2.3±0.0 | 0.4±0.0 | 3.4±0.0 | 0.6±0.0 |

| | | | | |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| 2-Methyl xylose | 2.0±0.0 | 0.1±0.1 | 3.4±0.1 | 0.2±0.0 |
| Arabinose | 12.2±0.1 | 13.0±0.1 | 12.6±0.1 | 8.5±0.0 |
| Xylose | 1.0±0.1 | 0.7±0.1 | 0.5±0.1 | 2.9±0.1 |
| Apiose | 1.0±0.1 | - | 1.8±0.0 | - |
| Aceric acid | 1.5±0.3 | - | 2.0±0.0 | 0.2±0.2 |
| Mannose | 0.9±0.0 | 1.7±0.0 | 0.3±0.0 | 1.9±0.0 |
| Galactose | 19.2±0.2 | 53.5±0.2 | 9.0±0.1 | 13.8±0.1 |
| Glucose | 1.3±0.0 | 0.8±0.0 | 0.5±0.1 | 2.1±0.0 |
| Galacturonic acid | 34.9±0.3 | 17.9±0.0 | 36.9±0.1 | 37.5±0.9 |
| Glucuronic acid | | 0.3±0.0 | 2.9±0.1 | |

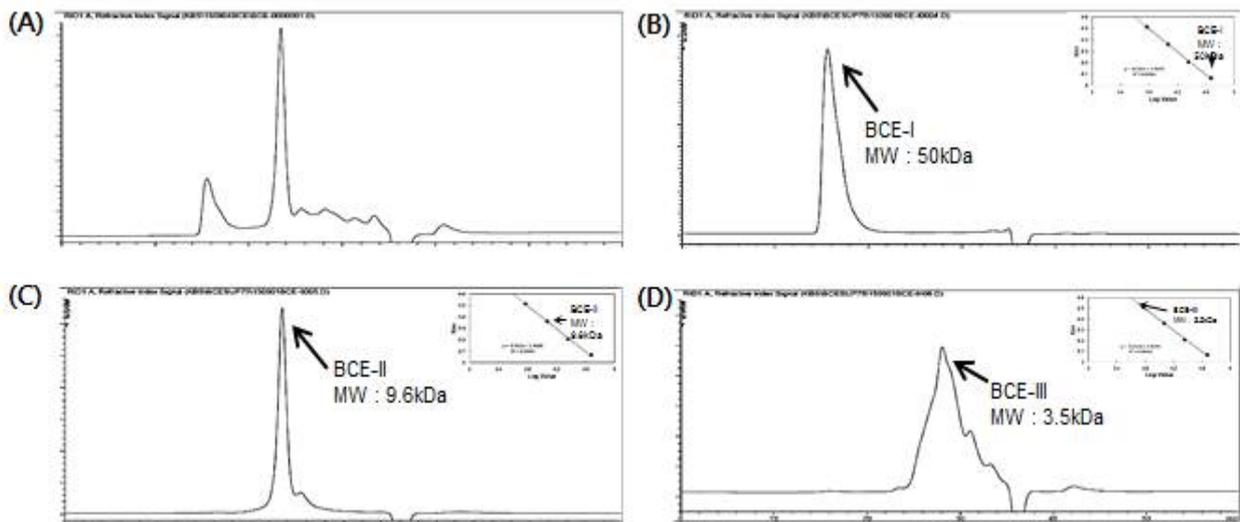


Fig 223. Elution pattern of BCE-0 isolated from broccoli on size exclusion HPLC. HPLC was equipped with Superdex 75 GL column.

마. 브로콜리 유래 효소 처리 다당획분의 면역활성 및 항암활성 평가

(1) 브로콜리 유래 효소 처리 다당획분의 항보체 활성

- 보체계(complement)는 C1~C9의 활성 단백질과 조절인자를 포함하여 약 20여 종의 혈중 순환 단백질들로 구성된 효소반응계로 적혈구, 백혈구, 망상내피계 세포나 다른 여러 조직의 세포들의 보체 수용체를 통해 보체계 단백질과 이러한 면역 세포 간의 일련의 정보 전달이 가능하며, 외부감염 병원체 등 침입인자를 항체의 존재 또는 비존재 하에 비특이적으로 제거하는 생체의 주요 방어기구임.

- 보체계가 활성화되면 연속적인 cascade 반응에 의하여 보체 단백질이 활성화 분자로 분해되고 이들이 침입인자의 표면에 부착되어 최종적으로 MAC(membrane attack complex)를 형성하여 감염 병원체 등을 제거하는 것으로 알려져 있음. 또한 보체 활성화 과정 중 생성되는 여러 보체 분해산물은 각종 생리반응을 매개한다고 알려져 있으며, 특히 macrophage와 lymphocyte의 활성화, 면역증강 등과 밀접한 상관관계가 있다고 보고되고 있음.
- 외부 물질에 대한 적응 면역이 발생하기 전에 인체의 초기 면역 반응에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 보체계에 대하여 브로콜리 유래 정제 다당체의 활성화 여부를 측정하기 위해 Mayer법에 따라 항보체 활성을 측정하였음.
- 양성대조군으로 운지버섯(*Coriolus versicolor*) 유래 면역 활성화 다당체인 PSK(polysaccharide K)를 사용했고, 음성대조군으로써 시료를 첨가하지 않은 증류수를 이용하여 음성대조군에서의 활성화 정도를 ITCH₅₀ 0%로 하여 각 시료의 활성화능을 확인하였음.
- Fig. 32에 나타낸 바와 같이 브로콜리 유래 정제 다당 BCE-I 1000 µg/mL의 경우 양성 대조군 PSK 500 µg/mL의 농도 대비 약 35 %의 활성을 나타내어 단순 효소처리 조다당 BCE-0에 비해서는 2 배 이상의 높은 활성을 나타내었지만 그 정도는 미미하였음.
- 일반적으로 1000 µg/mL의 농도에서 60% 이상의 항보체 활성을 나타내는 다당체는 그 약리활성이 통상적으로 인정되기 때문에 브로콜리 유래 정제 다당 BCE-I의 경우에는 단순 효소처리 조다당 BCE-0 보다는 높은 활성에도 불구하고 약리 활성이 존재한다고 보기에는 그 활성이 낮은 것으로 사료되었음.

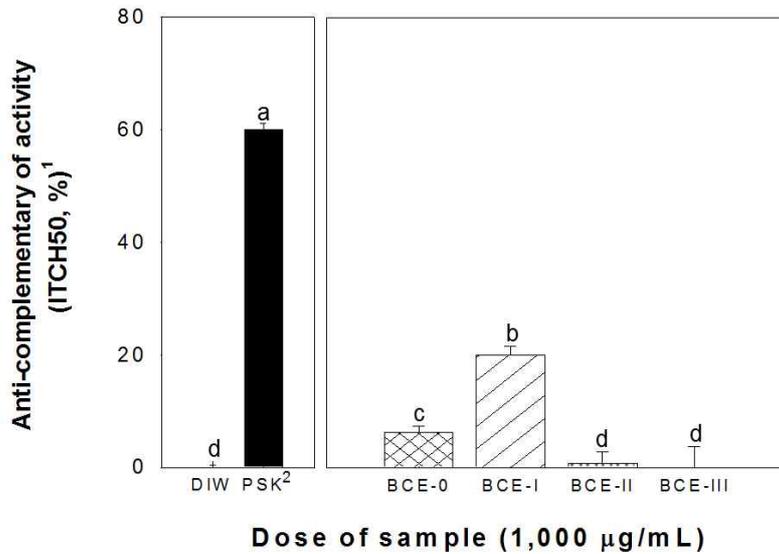


Fig 224. Anti-complementary activity of BCE-0, BCE-I, BCE-II and BCE-III isolated from broccoli. ¹Anti-complementary activity was presented as the inhibition of 50% total complementary hemolysis by Mayer's method. ²PSK, a known immuno-active polysaccharide from *Coriolus versicolor* was used as a positive control. Means with different superscript letters (a-d) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(2) 브로콜리 유래 효소 처리 다당획분의 정상세포 및 암세포에 대한 세포독성

(가) 브로콜리 유래 효소 처리 조다당 BCE-0의 정상세포 및 암세포에 대한 세포독성

- Mouse의 복강으로부터 분리한 일반세포인 macrophage 및 macrophage 유래 cell line Raw 264.7과, 종양세포주인 mouse 유래 colon cancer cell lines Colon26-M3.1, human lung cancer cell lines A549 및 human colon cancer cell lines HT-29를 이용하여 브로콜리 유래 조다당 BCE-0에 의한 세포 독성여부를 측정하였음(Fig. 33 및 Fig. 34).
- 1×10^6 cells/mL로 조정된 종양 및 일반세포주에 BCE-0를 8 μ g에서 1000 μ g까지의 다양한 농도로 가하여 배양한 후 세포의 생존여부를 확인한 결과, 복강에서 분리한 macrophage에 대해서는 고농도로 갈수록 오히려 증식능을 보여주었으며, 모든 종양세포주에 대한 세포독성은 유의적으로 나타나지 않았음.

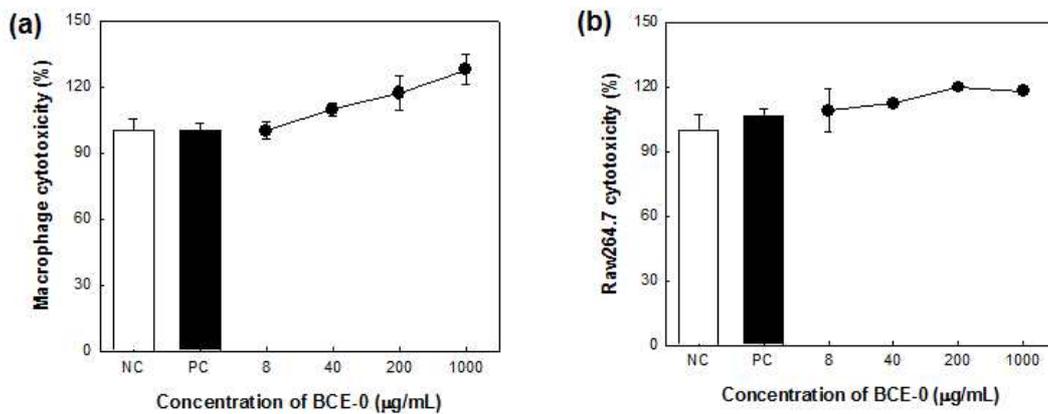


Fig 225. Cytotoxic effect of the crude polysaccharide, BCE-0 isolated from broccoli by digests of pectinase on peritoneal macrophages and Raw264.7 cell line *in vitro*.

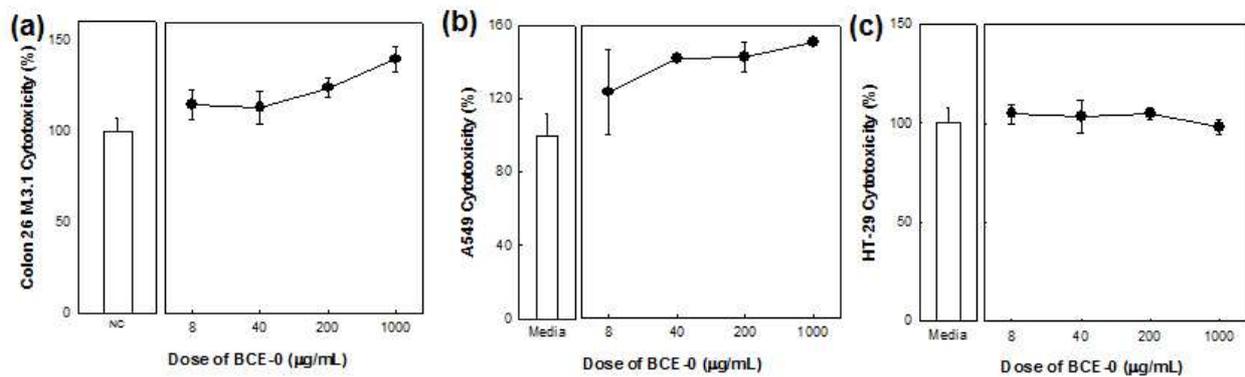


Fig 226. Cytotoxic effect of the crude polysaccharide, BCE-0 isolated from broccoli by digests of pectinase on Colon26-M3.1, A549 and HT-29 cell lines *in vitro*.

(나) 브로콜리 유래 효소 처리 정제다당의 정상세포 및 암세포에 대한 세포독성

- 브로콜리 유래 효소 처리 정제 다당 BCE-I, BCE-II 및 BCE-III의 종양세포 및 일반 세포에 대한 세포독성 여부를 확인하고자 일반세포 peritoneal macrophage (primary cell culture) 및 Raw 264.7 cell line과 종양세포 Colon26-M3.1, A549 및 HT-29 cell line을 이용하여 세포에 대한 직접적인 독성측정실험을 수행하였음.
- 실험에 적용한 모든 농도의 실험군에 있어 세포의 사멸은 확인되지 않았으며, BCE-I, BCE-II 및 BCE-III 모두 고농도인 1000 µg/mL에서도 일반세포(Fig. 35) 및 종양세포 (Fig. 36)에 대한 직접 독성을 나타내지 않는 결과를 보였음.
- 한편 peritoneal macrophage의 경우 BCE-I의 농도가 증가함에 따라 오히려 세포 증식 능이 나타나 mitogen 활성이 있음을 확인하였음.

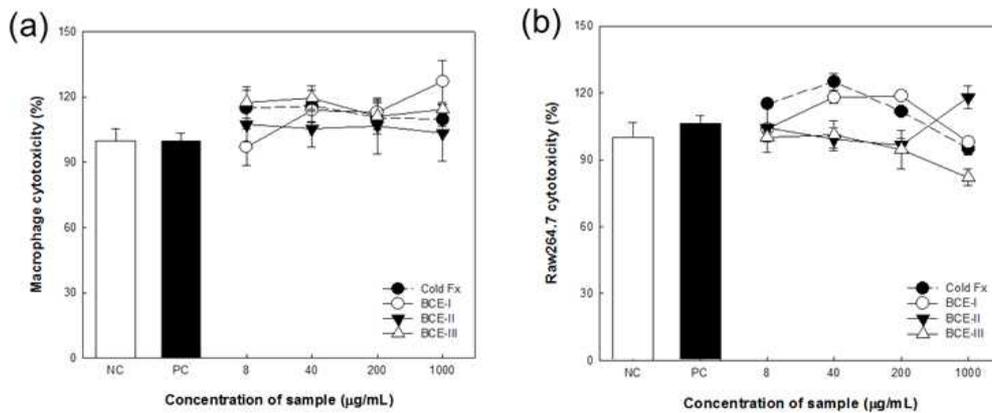


Fig 227. Cytotoxic effect of three subfractions purified from the crude polysaccharide of broccoli on peritoneal macrophages (a) and Raw 264.7 cells (b) *in vitro*. NC : media as a negative control, PC : 5 µg/mL of lipopolysaccharide(LPS) as a positive control, Cold Fx™: Functional material that helps relieve symptom of cold, flu and boosts the immune system obtained in Canada.

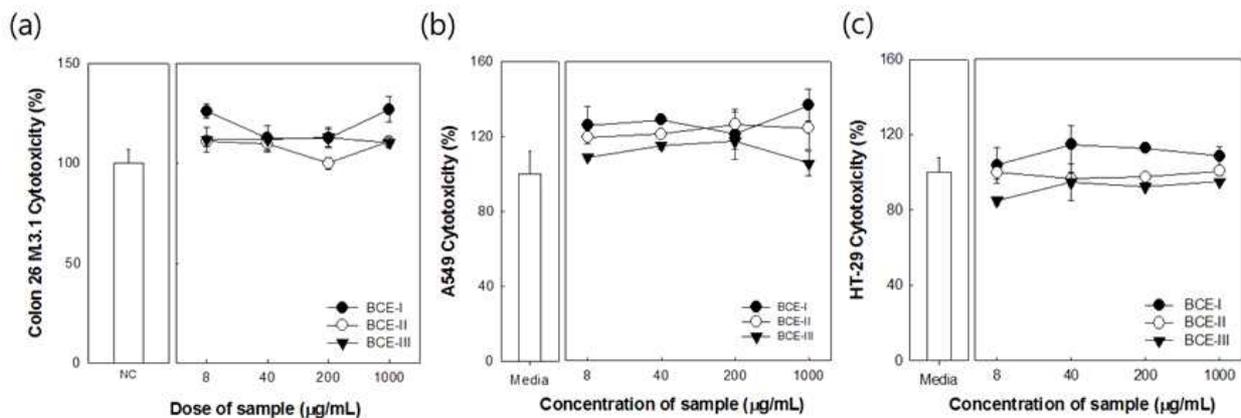


Fig 228. Cytotoxicity effect of three subfractions purified from the crude polysaccharide of broccoli on Colon 26 M3.1 mouse colon cancer cell lines (a), A549 human lung cancer cell lines (b) and HT-29 human colon cancer cell lines (c) *in vitro*. NC : media as a negative control

(3) 브로콜리 유래 효소처리 다당획분이 대식세포(macrophage)의 cytokine 생산에 미치는 영향

○ Macrophage는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 cytokine을 분비하여 면역현상을 조절하며, 항원에 대한 면역작용의 중추적인 역할을 하는 세포로서, 항원제시와 림프구의 비 특이적 면역작용에 관계하며, 종양세포에 대해서는 직접

적인 상해활성을 나타냄.

- 또한 TLR (toll like receptor)에 반응하는 물질(LPS 혹은 천연물)은 macrophage를 활성화하여 T세포와 B 세포의 증식, 식균 작용을 위한 대식세포의 활성화, 미생물 감염에 대한 방어 등의 2차 면역반응을 조절할 수 있는 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF- α 와 같은 cytokine을 생산한다고 알려져 있음.
- IL-6 및 TNF- α 는 macrophage에 의해 유도되는 대표적인 cytokine으로써 세균감염에 따른 염증반응에 있어서 중추적인 역할을 하며, 특히 IL-6는 IL-1과 협동적으로 작용하여 T 세포와 B 세포의 분화에 관여하고 항암효과가 있다고 보고되고 있으며, IL-12는 NK cell의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응을 유도하는 cytokine으로써 암세포와 같은 세포성 외래물질에 대한 반응성을 높이는 작용을 한다고 알려져 있음.
- 천연물 유래 다당에 의한 대식세포 활성화는 대식세포의 특이 수용체(specific receptor)에 다당 분자가 인식(recognition)되면서 매개된다고 생각되고 있음. 이들 수용체는 pattern recognition 분자로 알려진 세포막 결합 단백질로 면역반응 초기에 외부에서 들어온 ligand를 인식할 수 있는 분자임.
- 특히 대식세포는 toll-like receptor(TLR), CD14, complement receptor 3(CR3), scavenger receptor, dectin-1 및 mannose receptor를 경유하여 식물 기원의 다당 또는 당단백질과 결합이 가능하다고 알려져 있음. 이들 수용체의 활성화는 일련의 연속된 세포 내 신호전달을 유도하고 결과적으로 핵 내에서 iNOS(inducible nitric oxide synthase) 및 ROS의 생산과 관련된 특정 유전자의 전사의 활성화 및 다양한 cytokine의 생산으로 이어지며, 또한 이들 다양한 활성 단백질의 유도는 세포의 탐식능 증가 및 증식을 유도하기도 함.
- 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0 및 정제다당 BCE-I, -II, -III에 대하여 복강 유래 macrophage의 cytokine 생산을 *in vitro*에서 측정 한 결과, 활성다당 BCE-0과 BCE-I에서 cytokine의 생산을 촉진함을 확인하였으며, BCE-II와 BCE-III에 대해서는 cytokine 생산능이 전혀 나타나지 않았음 (Fig. 37(A), (B), (C)).
- BCE-0는 IL-6와 TNF- α 에서 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도부터 농도 의존적으로 생산함을 확인하였으며, BCE-I의 경우, IL-6, IL-12 및 TNF- α 모두 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도부터 높은 생산능을 나타냄으로써 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0보다 우수한 생산능을 나타낸다고 확인되었음.
- 특히 브로콜리 유래 효소처리 정제획분 BCE-I은 IL-6와 TNF- α 의 경우 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 positive control인 LPS에 준하는 유사한 활성을 나타내었으며, IL-12에서는 LPS 대비 60% 정도 활성을 나타냄을 확인하였음. 이는 브로콜리 유래 효소처

리 조다당 BCE-0의 면역활성은 주로 고분자획분 BCE-I이 기여할 것이라 사료되었음.

- 특히 현재 북미에서 감기 등을 예방할 수 있는 면역증강 건강기능성 식품으로 많이 판매되고 있는 화기삼 유래의 다당체로 만든 Cold Fx™을 또 다른 positive control로 비교하였을 때, cytokine 생산량의 경향이 거의 유사함을 확인하여 면역증강에 우수할 것으로 추측할 수 있었음.
- 본 실험에서 macrophage를 브로콜리 유래 효소처리 정제획분 BCE-I에 의해 24시간 자극한 결과, 염증부위에 면역세포의 귀소와 직접 관련이 있는 염증성 cytokine으로 분류되는 IL-6과 TNF- α 의 생산 및 세포성 면역능의 활성화와 직접 관련이 있는 IL-12를 유의하게 생산하는 활성이 있음이 확인 되었으므로 브로콜리 유래 효소처리 정제획분 BCE-I은 생체방어에 작용하는 macrophage 수용체에 결합한 다음 세포 내 신호전달을 유도하여 핵 내에서 cytokine을 유도시켜 면역기구를 활성화(조절)하는 기능이 있다고 판단하였음.
- 특히 IL-12는 암세포 존재 시, 암세포 치사작용을 하는 NK cell 활성화에 직접 관여하므로 항암 활성 유도에 필수적인 cytokine으로 인정되고 있으므로, 브로콜리 유래 효소처리 정제획분 BCE-I에는 NK cell 활성화 기능도 있을 것으로 기대되었음.

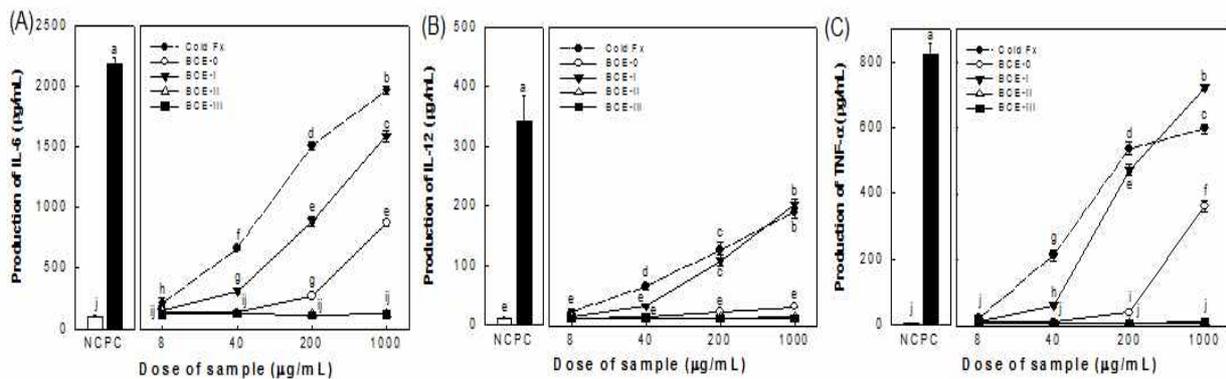


Fig 229. Effect of three subfractions purified from the crude polysaccharide of broccoli on cytokine production by murine peritoneal macrophages in vitro.

NC : Media as a negative control, PC : 5 $\mu\text{g/mL}$ of Lipopolysaccharide (LPS) as a positive control, Cold Fx™: Functional material that helps relieve symptom of cold, flu and boosts the immune system obtained in Canada.

(4) 브로콜리 유래 효소처리 다당획분의 비장세포의 mitogenic proliferation 및 cytokine 유도활성

- 체내에 외부 항원이 들어오게 되면 감염을 막기 위하여 여러 가지 면역계가 작동하게 되는데, 이 때 1차적으로 대식세포와 보체계 등의 선천면역계가 작동하여 외부 항원을 직접적으로 제거하게 됨. 그러나 선천면역계는 특정 분자구조를 인식할 수 있는 수용체(pattern recognition receptor)를 발현하고 있어 인식되는 항원, 특히 미생물에 대하여 반응하지만 감염이 반복되어도 반응이 동일하게 나타나게 됨.
- 반면 적응면역계는 항원을 인식하기 전까지는 반응이 일어나지 않게 되지만, 인식이 되면, 수일에 걸쳐 항원에 대하여 반응이 일어나게 되고, 이는 항원에 대하여 특이적으로 작용하게 되며, 특히 동일한 항원에 대하여 재감염이 일어나면 면역학적인 기억이 작용하게 되어 더욱더 강력한 반응이 일어난다고 알려져 있음.
- 체내의 2차 림프조직으로서 림프구를 통하여 적응 면역을 담당하는 비장(spleen) 세포를 이용하여 시료에 의해 나타난 증식능과 cytokine을 측정하였음. 먼저 비장세포에 대한 증식능을 확인한 결과(Fig. 38(A)), 브로콜리 유래 효소처리 정제 획분 BCE-I과 BCE-II 두 시료 모두 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 고농도에서도 증식능이 나타나지 않은 반면, BCE-0와 BCE-III에서는 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 오히려 약간의 독성이 확인되었음.
- 나아가 적응 면역세포의 일종인 T helper (T_h) cell 활성능에 대한 실험을 진행하였음. 먼저, T_h0 cell은 항원제시세포로부터 분비한 IL-12를 인식하게 되면, T_h1 cell로 분화하여 IFN- γ , TNF- α 등의 cytokine을 분비하게 되고 이는 CTL, NK cell 및 macrophage 등의 세포 면역(cell immunity)를 활성화한다고 알려져 있음.
- 반면 T_h0 cell이 IL-4 cytokine을 인식하게 되면, T_h2 cell로 분화하여 IL-4 cytokine을 분비하게 되고, 이는 B cell을 활성화시켜, IgE 생산증가, 지방세포(mast cell) 등의 체액성 면역(humoral immunity)를 활성화한다고 알려져 있으나 T_h2 cell의 활성화는 immunoglobulin (Ig) E 생산과다나, 지방세포의 활성화를 과다하게 촉진 할 시, 알러지를 유발한다고 보고되어 있음.
- 따라서 브로콜리 유래 효소처리 다당 획분으로 T_h1 cell의 대표적 cytokine인 IFN- γ 와 TNF- α 생산량을 확인한 결과(Fig. 38(B)와 (C)), 브로콜리 유래 정제획분 BCE-I에서 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도를 처리하였을 때, IFN- γ 와 TNF- α 생산량이 유의적으로 증가됨을 확인하였고, 조다당 BCE-0의 경우 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서만 TNF- α 생산을 소량 나타내고 있음.
- 위 결과로부터 브로콜리 유래 효소처리 정제 획분 BCE-I은 적응면역 세포인 T_h1 cell로 분화를 유도하며, 각종 세포면역을 활성화시켜 항암 및 면역 활성을 일으킨다고 확

인되었음. 또한, T_h2 cell의 대표적 cytokine인 IL-4의 생산량을 확인한 결과(Fig. 38(D)), 모든 시료에서 생산량을 거의 없는 것으로 나타나 브로콜리 유래 다당획분에서는 알러지(allergy)를 유발할 가능성이 거의 없는 것으로 확인되었음.

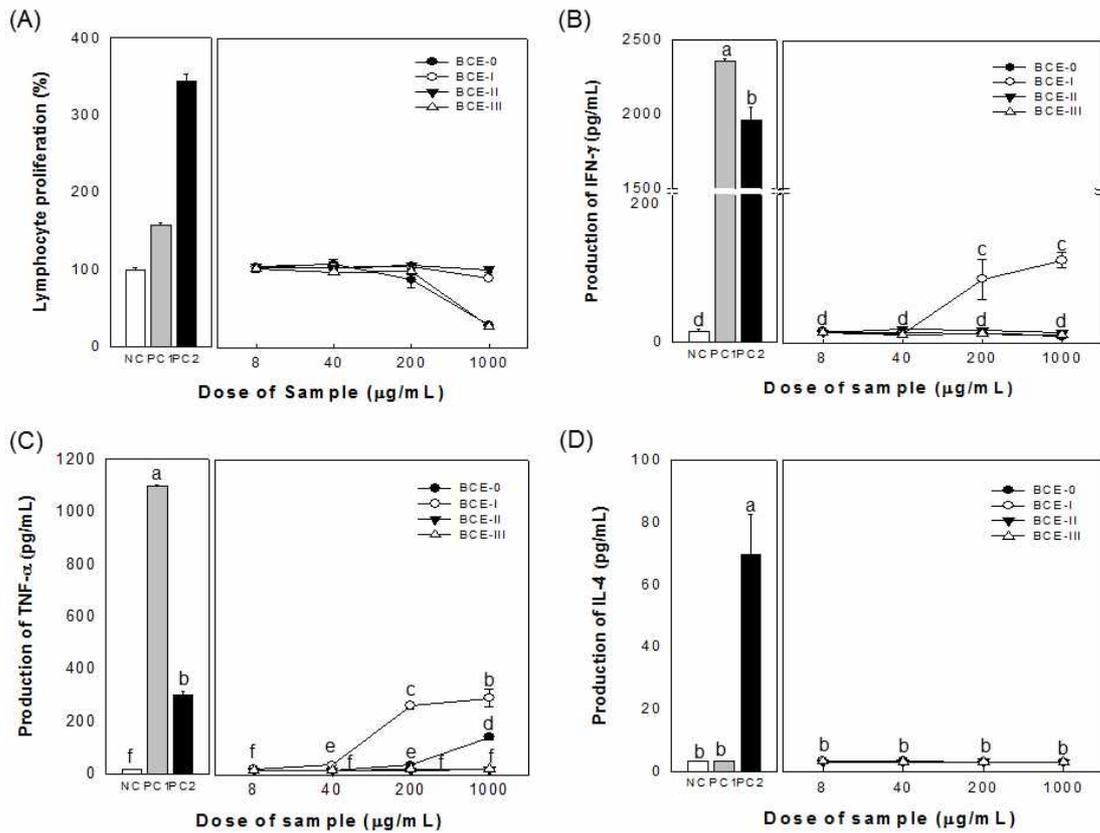


Fig 230. Effect of BCE-0, BCE-I, BCE-II and BCE-III on lymphocyte cytotoxicity (A) and cytokine production such as interferon (IFN)- γ (B), TNF- α (B) and IL-4 (D) by splenocyte *ex vivo*. NC: media as a negative control, PC1: 5 μ g/mL of LPS, PC2: 5 μ g/mL of concavalin A (ConA). Means with different superscript letters (a-f) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(5) 브로콜리 유래 효소처리 정제획분의 대식세포에 의한 NO 생산능 측정

○ Macrophage는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 산소 분자를 미생물을 살균시키는 고도반응성 산화제인 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)로 전환시키며, ROS 외에도 유도성 산화질소 합성 효소인 iNOS의 작용에 의하여 반응성질로 중간대사산물인 산화질소(nitric oxide, NO)를 생산하여 포식 용해소체 내에서 포식세포 산화효소에 의하여 발생하는 과산화수소나 과산화물과 결합하여 미생물을 사멸시키게 됨.

- NO는 반응성이 높은 자유 라디칼 중의 하나로 산소나 superoxide에 의해 N_2O_3 , NO_2 , nitrite 및 nitrate 등의 안정한 nitrogen oxide로 전환됨. NO는 NO 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의해 세포 내의 L-arginine으로부터 만들어지며, 체내 항상성 유지를 위한 endothelial NOS (eNOS)와 neuronal NOS (nNOS), 염증성 인자에 의해 생산되는 inducible NOS (iNOS)로 분류됨.
- 특히 iNOS에 의해 생산되는 NO는 외부로부터 유입된 병원체로부터 인체를 방어하는데 중요한 역할을 하며, 순환계 질환, 염증 질환 및 암과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있음. 따라서 브로콜리 정제 다당이 macrophage 유래 Raw 264.7 cell을 활성화 시켜 미생물을 사멸시키는 NO의 분비량을 측정하였음.
- 그 결과, 브로콜리 정제 다당인 BCE-I은 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 생산량이 증대되며, 농도 의존적으로 나타남을 확인하였으며, 이는 시판중인 면역 증강 기능성 식품인 Cold FX와 유사한 값을 나타내는 것으로 확인되었음(Fig. 39).

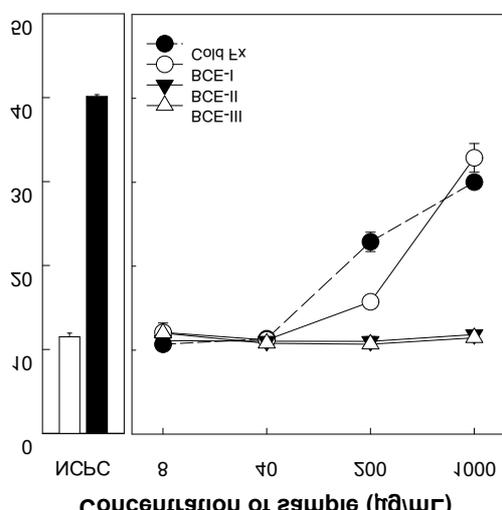


Fig 231. Effect of three subfractions purified from the crude polysaccharide of broccoli on NO production by Raw 264.7 cells *in vitro*. NC : media as a negative control, PC : 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of lipopolysaccharide (LPS) as a positive control, Cold FxTM: Functional material that helps relieve symptom of cold, flu and boosts the immune system obtained in Canada.

(6) 브로콜리 정제 다당의 자연 살해 세포에 의한 살해 활성능 (NK cell activity)

- NK cell (natural killer cell)은 혈액 내 림프구의 5-10%를 차지하는 림프구로서, 바이러스, 감염세포 뿐만 아니라, 체내의 암세포, 노후화된 세포를 파괴시키는 자연 면역기

능을 갖는 것으로 알려져 있음.

- NK cell이 가지고 있는 고유 receptor와 target cell의 ligand의 관계를 통하여 정상세포인지를 구분하며, 정상세포가 아닐 시, perforin을 분비하여 target cell의 세포막에 복합체를 생성하여 구멍을 뚫게 됨. 그 후, granzyme 효소가 분비되어 세포내부를 용해시키는 작용을 하며, 또한 NK cell이 활성화 되면 IFN- γ 등의 cytokine을 분비하여 적응면역계를 활성화시켜, macrophage 및 cytotoxic T lymphocyte (CTL)의 활성화를 유도한다고 알려져 있음.
- 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0와 정제획분 BCE-I, BCE-II에 대하여 NK cell 자극활성을 target cell에 대한 cytolytic activity와 분비 물질인 granzyme B 및 IFN- γ 를 측정하였음 (Fig. 40). 그 결과, 모든 시료를 200 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 로 2회 정맥투여한 후 24시간 후에 얻어진 비장 유래 세포(splenocytes, NK cells)의 활성은 브로콜리 유래 효소처리 정제획분 BCE-I 시료에서만 target cell (YAC-1)에 대한 effect cell (splenocytes)의 비율(E/T ratio)이 높아질수록 종양세포에 대해 높은 살해능을 나타내었음. 그러나 BCE-II에서도 약간의 살해능이 나타남을 확인할 수 있었지만, 그 활성은 미미하였음.
- 또한 NK cell 활성을 나타내는 지표인 granzyme B와 IFN- γ 의 분비량을 확인한 결과에서도 브로콜리 유래 효소처리 정제 획분 BCE-I에서 가장 우수한 granzyme B와 IFN- γ 생산능을 확인할 수 있었음.
- 위 결과를 바탕으로 브로콜리 유래 효소처리 정제획분 BCE-I이 종양세포에 대한 높은 살해능을 나타냄으로써 NK cell의 활성화에 주로 공헌한다고 결론지었음.
- 한편, 앞선 실험서 우수한 NK cell 활성능을 보인 브로콜리 유래 효소처리 정제 획분 BCE-I을 이용하여 농도별로 NK cell 활성화에 대한 실험을 진행한 결과(Fig. 41), 비장 유래 세포의 NK cell 활성은 종양세포에 대하여 농도 의존적으로 살해능이 나타남을 확인할 수 있었으며, E/T ratio가 높아질수록 우수한 살해능이 나타남을 확인하였음.
- 또한 granzyme B 생산량에 있어서도 500 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 이상 정맥투여한 군에서 활성이 가장 우수한 것을 확인하였으며, IFN- γ 의 경우 500 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 농도에서만 가장 우수한 생산능을 나타내었음.
- 위 결과를 모두 종합해 보면 브로콜리 유래 효소처리 정제획분 BCE-I이 NK cell을 활성화시켜 브로콜리의 항암활성에 주로 공헌하는 것이라 최종 확인되었음.

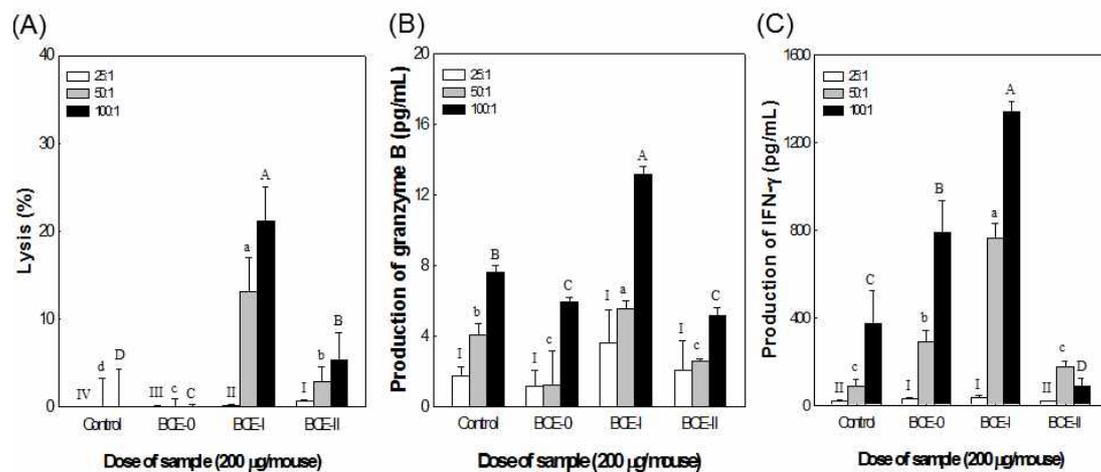


Fig 232. Effect of BCE-0, BCE-I and BCE-II on cytolytic activity (A) and cytokine production (B, C) of NK cells *ex vivo*.

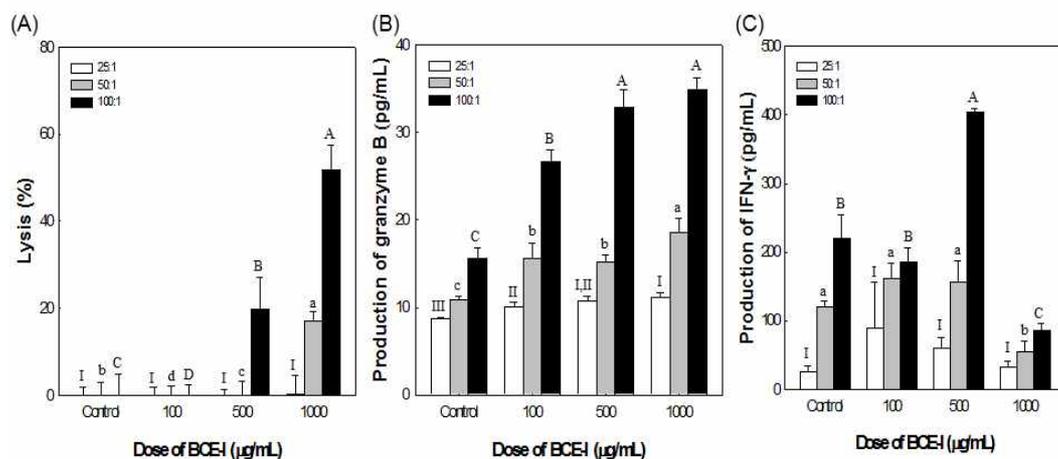


Fig 233. Effect of *i.v.* administration of BCE-I on cytolytic activity (A), and production of granzyme B (B) and IFN- γ (C) of NK cells. NK cells were cultured with YAC-I target in presence or absence of BCE-I for 6 hours or 24 hours at 37°C CO₂ incubator. Means with different superscript letters (I-III, a-d, A-D) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(7) 브로콜리 유래 효소처리 다당획분의 정맥투여를 통한 항전이 활성화

- 앞선 실험결과 강력한 NK cell 활성화능이 확인되어 이들의 항전이 활성을 측정하고자 브로콜리로부터 분리한 조다당 BCE-0와 정제 다당 BCE-I을 농도별로 정맥 주사한 후, Colon 26-M3.1 carcinoma cell을 정맥으로 투여하여 항전이 활성을 평가하였

음.

- 시료를 투여하지 않은 control 군의 종양의 수를 100% 전이된 것으로 하여 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0의 항전이 활성을 확인한 결과(Fig. 42), 100 µg과 500 µg의 BCE-0를 투여한 군에서 전이가 각각 33%, 44%가 저해되는 항전이 효과가 확인되었음. 그러나, 1,000 µg 고농도 투여군에서는 암전이가 16% 정도 억제되는 것으로 보아 오히려 낮은 농도에서 암전이 억제효과가 더 우수한 것으로 확인되었음.
- 한편, 이전 면역활성 실험에서 브로콜리의 주요 면역활성에 공헌한다고 확인된 브로콜리 유래 효소처리 정제획분 BCE-I의 항전이 활성을 측정한 결과(Fig. 43), 100 µg 저농도 투여군에서도 32%의 항전이 활성이 나타났으며, 특히 1,000 µg의 투여군에서는 77%의 높은 항전이 활성을 나타냄을 확인하였음.
- 이는 앞선 결과와 상응하게 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0에 비해 정제획분 BCE-I의 활성이 훨씬 더 우수하다는 것을 재차 확인시켜 주는 결과였으며, BCE-I의 항전이 활성은 앞선 NK cell 활성을 나타내었던 시료농도와 비교하였을 때 동일한 결과를 나타냄으로써 BCE-I에 의한 종양전이 억제효과는 NK cell의 활성화에 기인한 효과일 수 있음이 예측되었음.
- NK cell은 macrophage에 의해 생산되는 IL-12에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있으므로 BCE-I에 의해 macrophage의 IL-12 생산이 유도되고 이들의 자극에 의해 활성화된 NK cell에 의해 강력한 항전이 효과를 유도한 것으로 사료되었음.

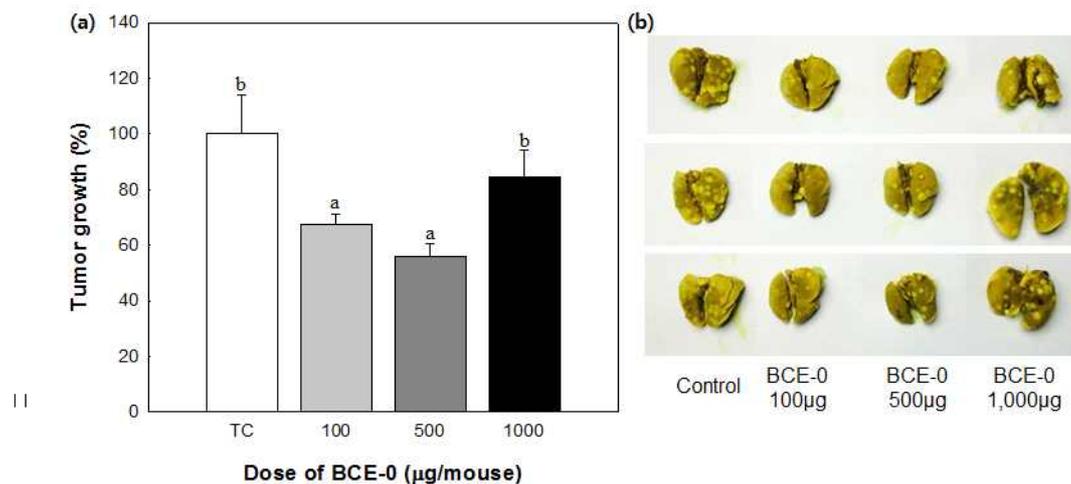


Fig 234. Inhibitory effect of BCE-0 from Broccoli on lung metastasis produced by *i.v.* inoculation of Colon26-M3.1 carcinoma cells. (A) Five BALB/c mice per group were inoculated *i.v.* with 4×10^4 Colon26-M3.1 carcinoma cell and injected *i.v.* with the indicated

doses of polysaccharides suspended in PBS two days prior to tumor inoculation. Mice were sacrificed 14 days after tumor inoculation for the evaluation of tumors. (B) Scanned images of mouse lungs excised after *i.v.* inoculation of Colon 26-M3.1 carcinoma cells.

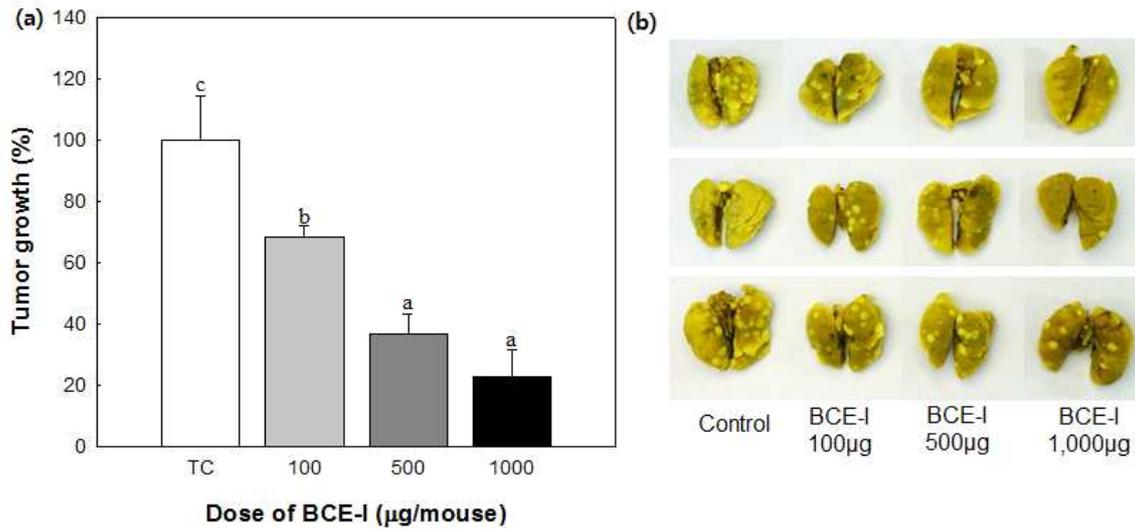


Fig 235. Inhibitory effect of BCE-I from Broccoli on lung metastasis produced by *i.v.* inoculation of Colon26-M3.1 carcinoma cells. (A) Five BALB/c mice per group were inoculated *i.v.* with 4×10^4 Colon26-M3.1 carcinoma cell and injected *i.v.* with the indicated doses of polysaccharides suspended in PBS two days prior to tumor inoculation. Mice were sacrificed 14 days after tumor inoculation for the evaluation of tumors. (B) Scanned images of mouse lungs excised after *i.v.* inoculation of Colon 26-M3.1 carcinoma cells.

(8) NK cell 기능이 제어된 mouse에서의 브로콜리 유래 효소처리 다당획분의 항전이 활성

- 실험전이 모델에서의 BRM (biological response modifier) 물질의 투여에 의한 항종양 활성은 주로 대식세포나 NK cell의 활성화가 주로 작용한다는 것은 잘 알려져 있음. 따라서 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0와 정제획분 BCE-I의 항전이 활성이 NK cell 자극에 의한 효과인지 여부를 확인하기 위하여 rabbit anti-asialo GM1 항체를 이용하여 mouse의 NK cell 기능을 block한 후 Colon 26-M3.1 lung carcinoma cell 을 이용한 항전이 활성측정 실험을 수행하였음 (Fig. 44).

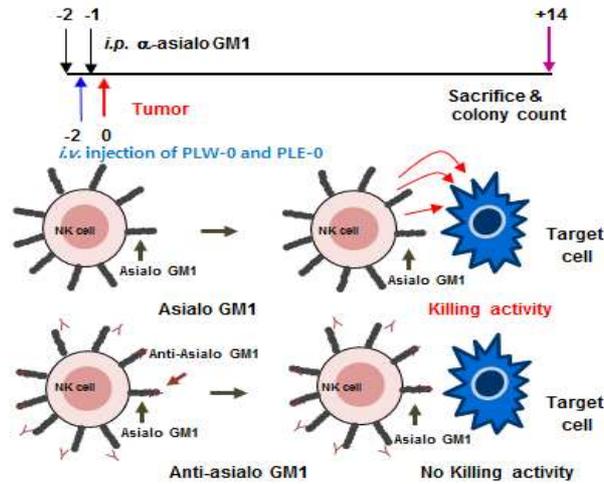


Fig 236. Assay principles for identification of the roles of NK cells on the anti-metastatic activity.

- Mouse에 500 µg과 1000 µg의 BCE-0 시료(Fig. 45)와 BCE-I (Fig. 46)를 각각 투여한 결과, 두 시료 모두 우수한 항전이 효과를 보여준 반면 NK cell 기능을 block한 mouse에 BCE-0를 500 µg 투여한 경우와 BCE-I을 500 µg, 1000 µg 투여한 경우 anti-asialo GM1만을 처리한 군보다 적은 수의 colony가 관찰되었으며, BCE-0를 1000 µg 투여한 경우에는 anti-asialo GM1만을 처리한 군과 유사한 colony가 관찰되었음.
- 위의 결과를 종합해보면, 브로콜리 유래 효소처리 정제획분 BCE-I의 항전이 효과는 주로 NK cell의 활성화에 기인하지만 일부 NK cell 이외의 다른 면역세포(예를 들어, CTL, macrophage)가 항전이 효과에 작용할 것으로 사료되었음. 반면 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0의 항전이 효과는 NK cell에 의해서만 항전이 효과가 나타나는 것으로 확인되었음.
- 여러 실험 보고에서 실험동물 전이 모델에서 천연물에 의한 항종양 전이 효과는 주로 tumoricidal macrophage 및 NK cell에 의하여 유도되는 것으로 보고되고 있으므로, BCE-0와 BCE-I 모두 항종양 효과는 대부분 시료에 의한 NK cell 활성화가 직접 관여하고 있으며, 일부 macrophage, T세포 등의 면역세포 활성화가 관여됨을 추측할 수 있었음.

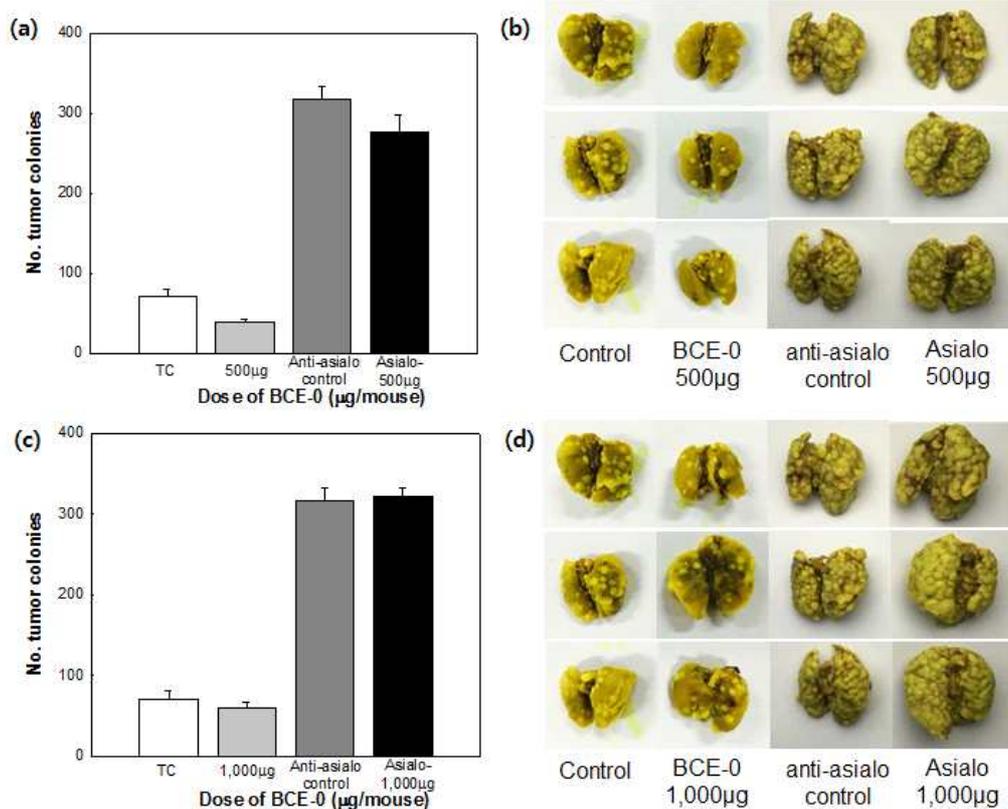


Fig 237. Effect of NK cell depletion on the anti-metastatic activities of BCE-0 from broccoli. To deplete NK cells *in vivo*, rabbit anti-asialo GM1 serum was injected into mice at 1 and 3 days before inoculation of Colon 26-M3.1 cells. Mice were administered *i.v.* with BCE-0 (500 µg, 1000 µg) 2 days before tumor inoculation. Mice were sacrificed 14 days after tumor inoculation for evaluation.

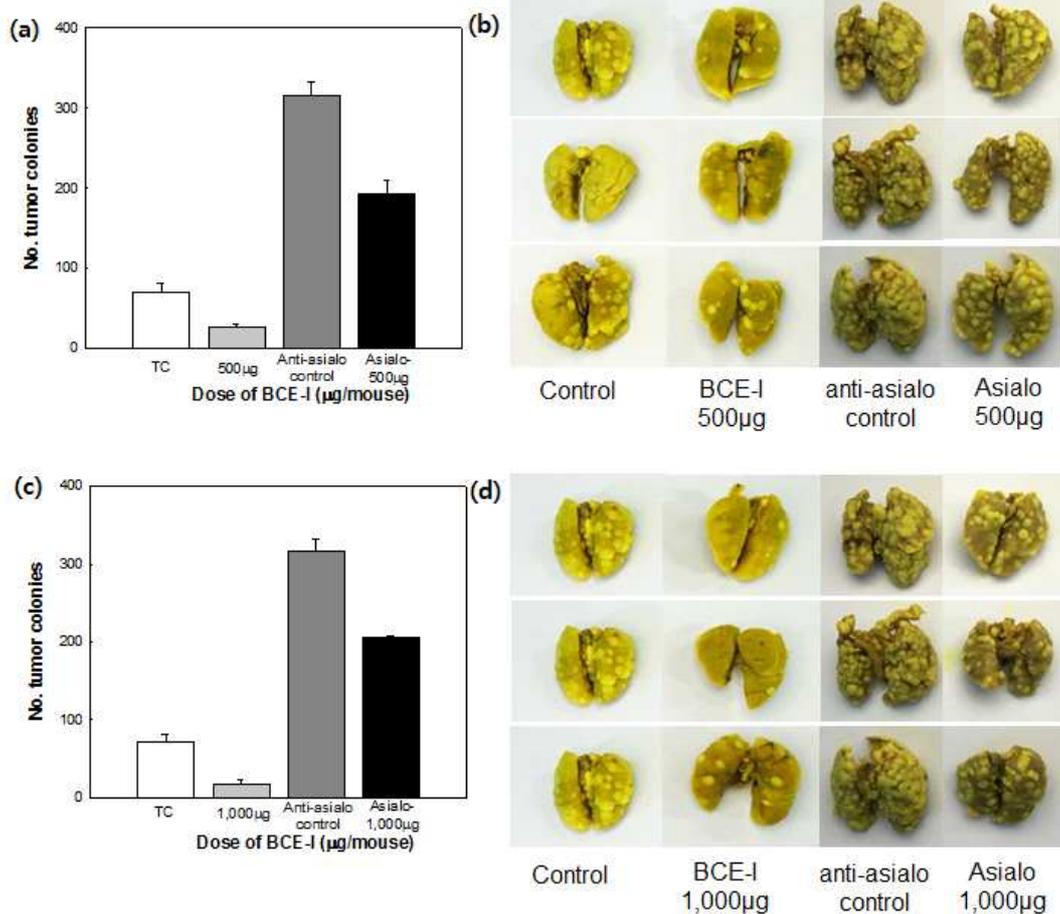


Fig 238. Effect of NK cell depletion on the anti-metastatic activities of BCE-I from broccoli. To deplete NK cells *in vivo*, rabbit anti-asialo GM1 serum was injected into mice at 1 and 3 days before inoculation of Colon 26-M3.1 cells. Mice were administered *i.v.* with BCE-I (500 µg, 1000 µg) 2 days before tumor inoculation. Mice were sacrificed 14 days after tumor inoculation for evaluation.

(9) 세포독성 T 림프구에 의한 종양전이주 살해능 측정

- 인체는 비자기세포에 감염되었을 때 선천면역 세포인 대식세포, NK 세포, 보체계 등이 활성화되어 비자기세포를 제거하는 면역 반응을 일으키며, 대식세포가 비자기세포를 인식하고, 포식하면 세포질 내에서 단백분해효소를 생산하여 포식된 세포를 사멸시키며, 동시에 미생물 단백질로부터 발생된 펩티드는 적응면역반응을 일으키기 위하여 T림프구에게 항원을 제시하게 됨.
- 이후, 항원을 인식한 T 림프구를 세포독성 T 림프구, 보조 T 림프구 및 기억 T 림프구로 분화되어 적응 면역을 작동하게 됨.

- 앞서 NK 세포의 기능이 제어된 mouse에 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0 및 정제획분 BCE-I을 정맥주사 한 후 Colon26-M3.1 cell을 투여하여 항전이 활성에서 BCE-0의 경우에는 주로 NK cell에 의해서만, BCE-I의 경우에는 NK cell 이외의 다른 면역세포에 의한 항전이 활성이 나타났으므로 이를 확인하고자 mouse의 비장을 적출하여 Colon26-M3.1 cell로 재감작하여 면역세포의 활성화를 측정하였음.
- 활성을 측정한 결과, 먼저 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0 시료를 투여하지 않은 control 군에 비하여 세포독성 T림프구의 활성이 증가한 것처럼 보이지만 유의적인 차이를 나타내지 않아 앞선 실험결과와 동일하게 나타나 항전이 효과가 주로 NK cell에 의해서만 나타난다는 것을 재차 확인시켜준 결과였음(Fig. 47).
- 반면 앞선 결과에서 NK cell 이외에 다른 면역세포가 항전이 효과에 관여할 것이라 예측되었던 브로콜리 유래 효소처리 정제 획분 BCE-I의 경우 시료를 투여하지 않은 control 군에 비하여 cytotoxic T lymphocyte의 활성이 유의적으로 증가되었음을 확인할 수 있었음(Fig. 47).
- 위 결과를 종합해보면 브로콜리로부터 분리한 조다당 BCE-0 및 정제획분 BCE-I은 적응면역 세포인 세포독성 T 림프구의 활성을 증가시키며, 이는 선천면역 세포인 대식세포 및 NK cell과 함께 적응면역을 증가시켜 숙주의 면역능을 증진시킬 수 있음이 시사되었음.

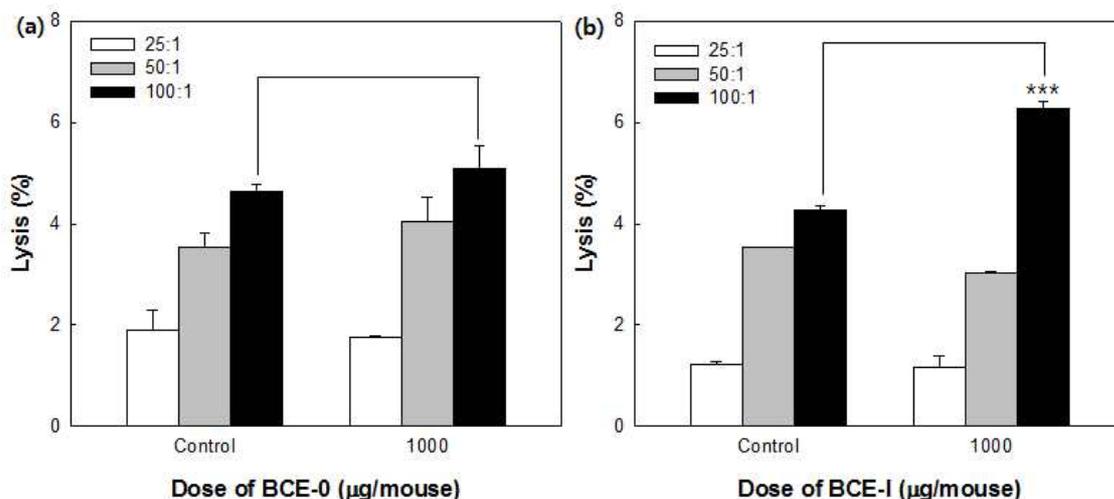


Fig 239. Effect of BCE-0 and BCE-I from broccoli on the activation of cytotoxic T-lymphocytes *ex vivo*. Mice were administered *i.v.* with the indicated doses of BCE-0 and BCE-I for 2 days, and then inoculated *i.v.* with 3×10^4 colon26-M3.1 carcinoma cells. Splenocytes were harvested and incubated with colon26-M3.1 cells. CTL activity was determined by using LDH kit after incubation 6 hr.

(10) 브로콜리 유래 정제획분 BCE-I의 경구투여에 의한 자연살해세포의 종양살해능 (NK cell activity)

- NK cell은 암세포 제거능력이 탁월하다고 알려져 있으며, 말초혈액 내 림프구의 5-10%를 차지하는 대과립 림프구로서 특이항원에 대한 사전 감지 없이 바이러스 감염세포나 암세포를 파괴시키는 자연 면역기능을 갖는 세포로, 특히 암 환자의 경우 NK cell의 수가 극히 감소되어 있는 것으로 알려져 있음.
- NK cell은 다음 두 가지 작용기작에 의해 작동하는 것으로 알려져 있는데 첫째, 자신의 class I HLA(인간백혈구항원)가 세포표면에 표현되는 세포, 즉 자가 세포는 죽이지 않고 바이러스에 감염되거나 암세포와 같이 class I HLA가 감소되어 있는 세포를 직접적으로 공격하여 제거하거나 둘째, NK cell이 interleukin과 같은 cytokine을 분비하여 이들에 의해 Tc lymphocyte (Cytotoxic T cell, 세포 살해성 T림프구), macrophage (대식세포)와 같이 감염세포 및 암세포에 대한 직접적인 공격능을 갖는 면역세포들을 활성화시킨다고 알려져 있음. 따라서 NK cell의 활성화효과는 단순한 항암효과의 기대 이외에도 체내 면역력의 증가와 유사한 연장선상에 있다고 할 수 있음.
- 앞서 정맥투여에 의한 NK cell 활성화 및 항전이 활성화실험에서 우수한 결과를 보였던 브로콜리 유래 정제다당 BCE-I 시료를 농도별로 20일간 격일로 mouse에 경구투여하고 NK cell 자극활성을 측정된 결과 (Fig. 48), 종양세포에 대하여 농도 의존적으로 살해능이 나타남을 확인할 수 있었으며, E/T ratio가 높아질수록 우수한 살해능이 나타남을 확인할 수 있었음.
- 또한 granzyme B 생산량에 있어서도 500 µg/mouse 이상 정맥 투여한 군에서 활성이 우수한 것을 확인하였음. 이를 통하여 BCE-I을 경구투여를 통해 확인된 NK cell 활성화는 단순히 정맥주사를 통해 NK cell의 활성을 측정하여 나타난 결과만큼 우수하다는 것을 확인하였으며, 이는 추후 과제가 종료되고 난 후, 임상실험을 진행하게 된다면 농도를 설정하는데 있어 중요한 지표가 되리라 사료됨.

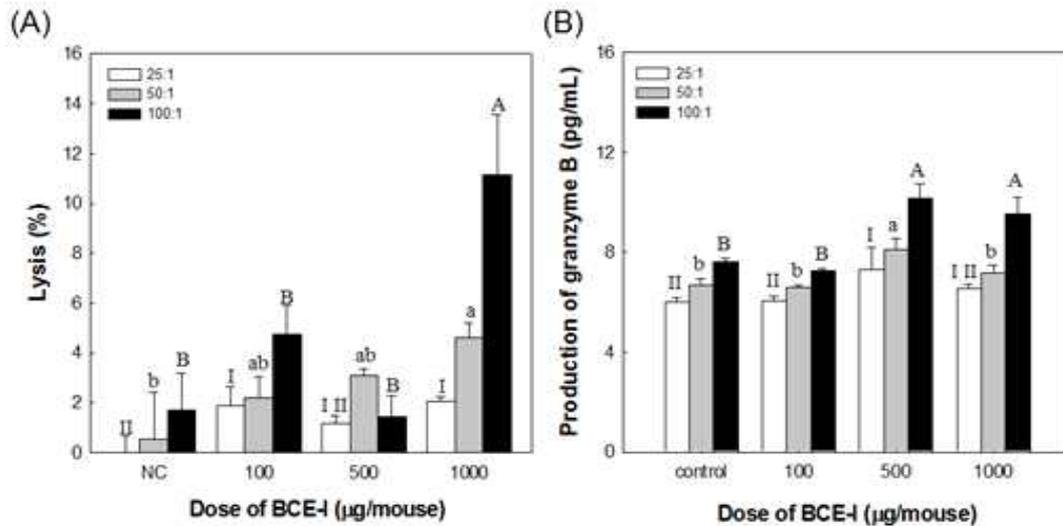


Fig 240. Effect of oral administration of BCE-I on cytolytic activity (A) and granzyme B production (B) of NK cells *ex vivo*. NK cells were cultured with YAC-I target in presence or absence of BCE-I for 6 h or 24 h at 37°C CO₂ incubator. Means with different superscript letters (I-II, a-b, A-B) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(11) 브로콜리 유래 정제획분 BCE-I의 경구투여에 의한 항전이 활성화

- 이전 실험에서 브로콜리 유래 효소처리 정제획분 BCE-I은 정맥투여를 통해 우수한 항전이 활성을 나타내었다고 확인한 바, 이를 경구투여를 통하여 항전이 활성을 재차 측정된 결과, 종양전이주 접종하기 20일 전부터 격일로 경구 투여한 후 Colon26-M3.1 cell을 접종하고, 5일까지 경구투여한 실험동물 모델에서 폐를 적출하여 항전이 활성을 측정하였음.
- 시료를 투여하지 않은 control군의 종양 수를 100% 전이된 것으로 하여 BCE-I의 항전이 활성을 확인한 결과 (Fig. 49), 1,000 µg의 투여군에서 약 20%의 항전이 활성을 확인하였으며, 농도의존적인 경향을 보여주었음.
- 위의 결과를 바탕으로 브로콜리 유래 효소처리 정제획분 BCE-I은 정맥투여뿐만 아니라 경구투여에서도 우수한 항전이 활성이 나타나는 것을 재차 확인할 수 있었으며, 앞선 경구투여를 통한 NK cell 자극 활성실험과 투여량을 비교하였을 때 유사한 결과로써 BCE-I에 의한 종양전이 억제효과는 NK cell의 활성화에 기인한 효과임을 예상할 수 있었음.

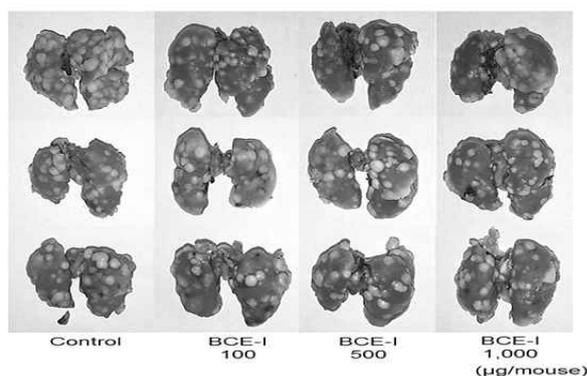
○ 또한 위 결과를 토대로 동물과 사람 간 상대적 약효평가 공식(daily dosage of oral administration)을 이용하여 일일섭취량을 추정하게 된다면, 성인 남성(60 kg) 기준 하루에 121.6 mg을 약 1달간 섭취하게 된다면, 약 20%의 종양 전이 억제효과를 나타낼 수 있을 것으로 추정할 수 있었음.

Daily dosage of oral administration

$$= 1,000 \mu\text{g}/\text{mouse} \times 50 \times 60 \text{ kg} \times \frac{1}{12.33} = 243.3 \text{ mg}/2\text{days}$$

(Mouse: 20g) (/kg) (person) (CF) (121.6 mg/day)

(A)



(B)

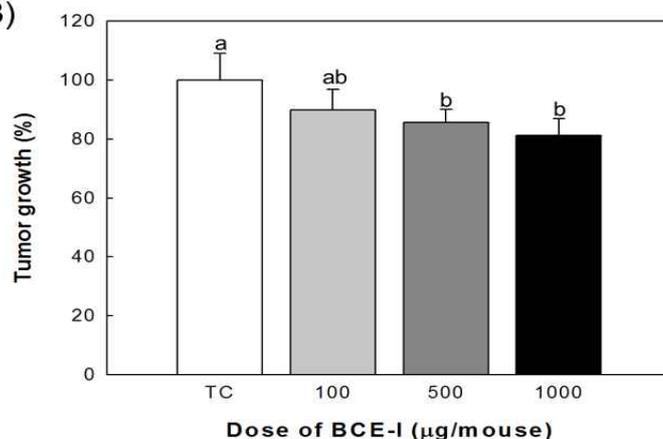


Fig 250. Effect of oral administration of BCE-I on lung metastasis produced by inoculation of Colon26-M3.1 carcinoma cells. Five BALB/c mouse per group were orally administrated with the indicated doses of BCE-I, and then inoculated *i.v.* with 3×10^4 Colon26-M3.1 carcinoma cells. Mice were killed at 14 days after tumor inoculation for evaluation of tumors. Means with different superscript letters (a-b) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

바. 브로콜리 유래 조다당 BCE-0의 대식세포 활성화 관련 분자 기작 규명

- 대식세포의 활성화는 감염 및 자극에 의해 생산되는 cytokine이나 nitric oxide 등에 의해 국소적인 감염으로부터 인체를 방어하고, 포획 섭취된 항원을 processing하여 항원제시세포로서 작용하여 적응면역계의 활성화를 유도함. 또한 생산된 cytokine에 의해 NK 세포를 활성화시켜 간접적으로 항암 활성을 유도할 수 있다고 알려져 있음.
- 식물 기원 다당체의 면역증진활성, 항암활성 및 기타 약리활성은 면역계 중 대식세포를 시작으로 일어나는 것으로 보고되고 있으며, 결과적으로 선천 면역계의 활성화에 의해 적응면역계의 활성화를 유발하여 인체의 방어 시스템을 작동시킨다고 알려져 있음.
- 대식세포와 수지상세포와 같이 선천면역계에 관여하는 세포들은 외부 물질 (foreign material, non-self)을 인식하는 첫 번째 면역세포로서 외부물질을 인식하기 위한 패턴인지(pattern recognition) 능력이 있으며 일부 특정 분자들은 미생물에서만 고유하게 존재하기 때문에, 즉각적으로 인지하여 침입한 병원체를 공격하는 강력한 선천면역반응을 이끌어 낼 수 있음.
- 식물 유래 다당에 의한 선천 면역계 활성화는 대식세포가 발현하고 있는 수용체에 의해 유도된다고 보고되고 있음. 이들은 Pattern Recognition Receptor(PRR) 분자로 알려진 세포막결합 단백질로 면역반응 초기에 외부의 ligand를 인식할 수 있는 선천면역계 수용체라고 알려져 있음.

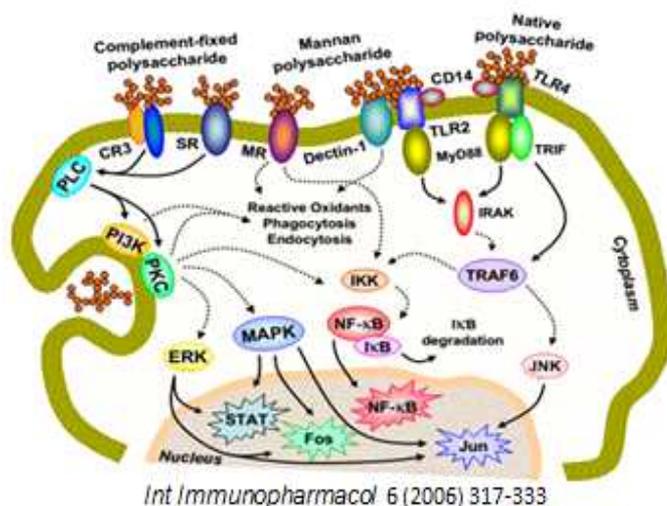


Fig 251. Signal transduction pathway through plant polysaccharides in mammalian cell

- 대식세포는 toll-like receptors (TLRs), CD14, complement receptor 3(CR3), scavenger receptor, dectin-1 및 mannose receptor 등을 발현하고 있으며, 이들 수용체를 통하여

식물 기원의 다당체 또는 당단백질과 결합이 가능하다고 보고되어 있는데 이들 선천면역계 수용체의 활성화는 일련의 연속된 세포내 신호전달을 유도하여 MAPK 단백질(ERK, p38, JNK) 및 NF- κ B 경로를 활성화시켜 결과적으로 핵 내에서 관련 유전자의 발현 조절을 통해 cytokine(IL-6 및 TNF- α 등) 및 관련 인자의 생산 조절을 유도 한다고 알려져 있음(Fig. 50).

(1) 브로콜리 유래 조다당의 Raw 264.7 cell lines에 대한 독성

- Macrophage 유래 cell line Raw 264.7를 이용하여 브로콜리 유래 조다당 BCE-0에 의한 세포 독성여부를 측정하였음(Fig. 51).
- 1×10^6 cells/mL로 조정된 세포에 BCE-0를 7.8 μ g에서 1,000 μ g까지의 다양한 농도로 가하여 배양한 후 세포의 생존여부를 확인한 결과, Raw 264.7 cell lines에 대한 독성은 나타나지 않았으며, 고농도로 갈수록 오히려 세포 증식능이 나타났음.

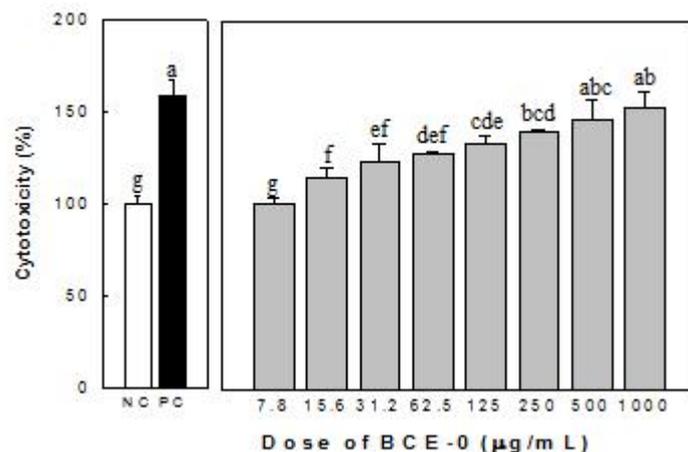


Fig 252. Cytotoxic effect of BCE-0 isolated from pectinase digests of broccoli on Raw 264.7 cell lines *in vitro*.

(2) 브로콜리 유래 조다당이 NO 생산에 미치는 영향

- Macrophage는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 산소 분자를 미생물을 살균시키는 고도반응성 산화제인 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)로 전환시키며, ROS 외에도 유도성 산화질소 합성 효소인 iNOS의 작용에 의하여 반응성질로 중간 대사산물인 산화질소(nitric oxide, NO)를 생산하여 포식 용해소체 내에서 포식세포 산화효소에 의하여 발생하는 과산화수소나 과산화물과 결합하여 미생물을 사멸시키게 됨.
- NO는 반응성이 높은 자유 라디칼 중의 하나로 산소나 superoxide에 의해 N_2O_3 , NO_2 ,

nitrite 및 nitrate 등의 안정한 nitrogen oxide로 전환됨. NO는 NO 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의해 세포 내의 L-arginine으로부터 만들어지며, 체내 항상성 유지를 위한 endothelial NOS (eNOS)와 neuronal NOS (nNOS), 염증성 인자에 의해 생산되는 inducible NOS (iNOS)로 분류됨.

- 특히 iNOS에 의해 생산되는 NO는 외부로부터 유입된 병원체로부터 인체를 방어하는데 중요한 역할을 하며, 순환계 질환, 염증 질환 및 암과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있음.
- 브로콜리 유래 조다당 BCE-0를 Raw 264.7 세포에 24 시간 동안 처리한 결과, BCE-0의 농도 의존적으로 NO를 생성하는 경향을 보였음. 특히, BCE-0 처리농도 250 ug/mL 부터 1000 ug/mL의 농도에서는 높은 수준의 NO 생성능을 나타내는 것을 확인하였음 (Fig. 52).

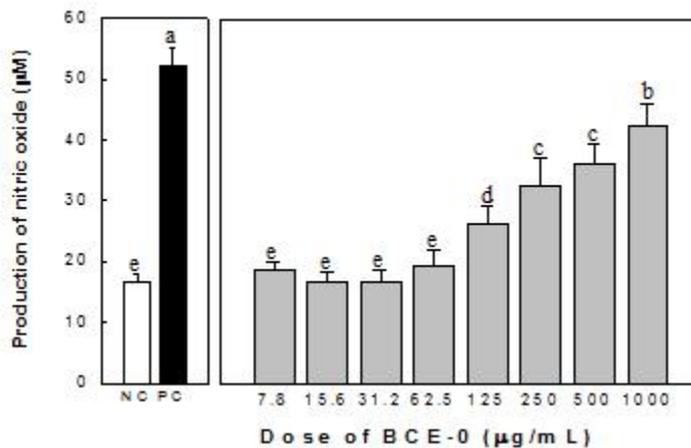


Fig 253. Effect of the BCE-0 on NO production in Raw 264.7 macrophage cell line. RAW 264.7 macrophages(3×10^6 cells/mL) were cultured in 96 well plate and stimulated with the BCE-0. After 24 h, culture supernatants were collected and nitrite was measured using Griess reagent. Equal volumes of Griess reagent(1:1 of 0.1% N-1 naphthylethylenediamine in 5% phosphoric acid and 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid) and sample were incubated together at room temperature for 10 min. Absorbance at 540 nm was measured using a microplate reader.

(3) 브로콜리 유래 조다당이 IL-6 및 TNF- α 생산에 미치는 영향

- Cytokine은 자가분비(autocrine), 주변분비(paracrine) 및 내분비(endocrine)등의 특성과 다면성(pleiotropy) 기능을 통하여 단계적인 유도 반응을 일으키므로 면역반응에 있어서 매우 중요한 인자로 알려져 있음.

- 대식세포에 의해 생산되는 cytokine IL-6 및 TNF- α 는 활성화된 대식세포에 의해 생산되는 대표적인 cytokine으로서, 감염 방어에 중요한 역할을 한다고 알려져 있음.
- 또한, IL-6는 T cell의 활성화 조절과 B cell을 활성화 시켜 IgA의 생산을 촉진시키는 역할 등 적응면역계의 활성화를 유도한다고 보고되어 있음.
- 브로콜리 유래 조다당 BCE-0를 Raw 264.7 세포에 24 시간 처리한 결과, 농도의존적으로 IL-6의 생산됨을 확인할 수 있었으나 그 양은 미미하였으며, 반대로 TNF- α 의 경우에는 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 이상부터는 positive control인 LPS에 준하는 활성을 나타내었음 (Fig. 53). 이를 통해 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0는 선천면역계의 활성화 인자로서 역할을 하는 것으로 판단되었음.

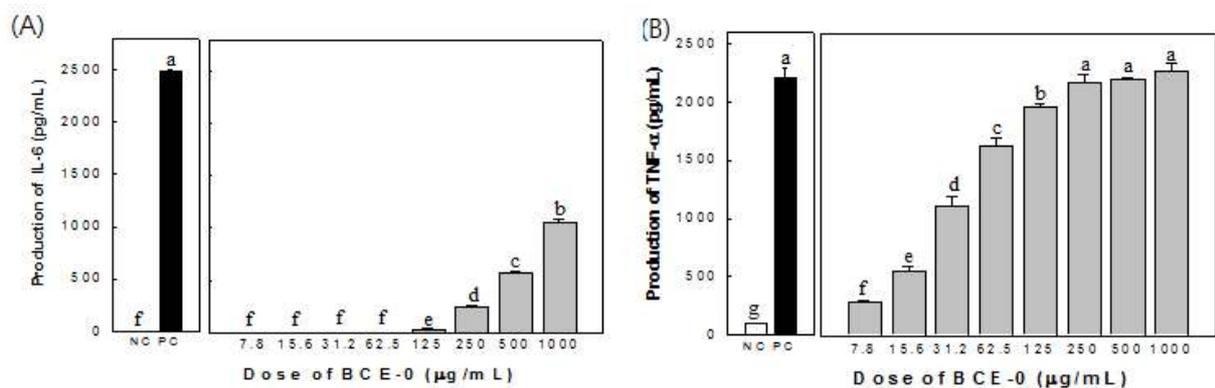


Fig 254. Effect of BCE-0 on production of IL-6 and TNF- α by Raw 264.7 murine macrophage cell line. Raw 264.7 macrophages (1×10^6 cells/mL) were cultured in 96 well plate and stimulated with the BCE-0. After 24 h, culture supernatants were collected and IL-6 and TNF- α was measured using mouse IL-6 and TNF- α ELISA kit.

(4) 브로콜리 유래 조다당 BCE-0의 대식세포 활성화 기전 분석

- 선천면역에 관여하는 많은 분자들은 패턴인식 수용체(pattern recognition receptor, PRR)를 발현하고 있어 특정 분자를 인지하는 능력이 있음. 즉 일부 특정 분자들은 다른 다세포 조직에서는 발견되지 않고 미생물에서만 고유하게 있기 때문에, 즉각적으로 인지하여 침입한 병원체를 공격하는 강력한 선천면역 반응을 나타낸다고 알려져 있음.
- 대식세포는 Toll like receptors, mannose receptor, CR3 및 Dectin-1 등 선천면역계 활성화 수용체를 발현하고 있어 LPS (리포다당) 혹은 beta-glucan과 같은 미생물 혹은 천연물 유래 다당 분자를 인식하고 결합하여 선천면역계 세포의 신호전달계를 활성화

한다고 알려져 있음.

- 따라서 선천면역계 수용체에 의한 세포 내 신호전달 연구방법을 이용하여 브로콜리 유래 조다당 BCE-0에 의한 선천 면역계 활성화 작용기전 연구를 진행하였음.

(가) 브로콜리 유래 조다당 BCE-0에 의한 MAPK 및 NF- κ B 활성화

- 대식세포에 존재하는 패턴인식수용체에 의해 활성화되는 대표적인 신호전달 단백질 가운데 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 및 NF- κ B(nuclear factor-kappa B)에 대해서는 비교적 상세하게 연구되어 있음.
- MAPK 신호전달 경로는 신호전달 효소들의 단계적 활성화 경로로 많은 세포 유형에서 발견되며 효모에서 인간에 걸친 진핵세포 범위에서 진화적으로 보존되어 있는데 이들은 p38, ERK, JNK의 세 종류로 구성되어 있으며, 최종적으로 핵 내로 이행하여 다양한 전사인자를 포함하는 AP-1 family를 활성화시켜 cytokine 및 NO 등의 생산을 유도한다고 알려져 있음.
- 한편 NF- κ B는 강력한 전사인자로서, 통상 세포질 내에 존재하는 비인산화된 형태의 I κ B에 의해 억제된 상태로 존재하고 있는데 리간드의 자극에 의해 IKK가 I κ B를 인산화시켜 분해되면, NF- κ B가 I κ B로부터 분리되어 핵으로 이동한다고 보고되어 있음.
- 핵으로 이동한 NF- κ B는 유전자들의 전사를 개시하게 되며 척추동물에서 NF- κ B의 존적인 경로는 다양한 cytokine을 생산하게 하여 T 림프구와 B 림프구의 신호전달경로에서 중요한 역할을 담당하기 때문에 적응면역계에서도 매우 중요한 인자로서 알려져 있음.
- 브로콜리 유래 조다당인 BCE-0에 의해 유도되는 IL-6 및 NO의 생산 기전을 확인하기 위하여, Raw 264.7 세포에 BCE-0를 농도별로 처리하여 진행하였음. 그 결과, MAPK(p38, ERK, JNK) 단백질의 전체량은 변화가 없음에도 불구하고, MAPK(p38, ERK, JNK)의 인산화는 BCE-0 농도 의존적으로 유도되는 것을 확인하였음(Fig. 54(a)).
- NF- κ B 신호전달 경로에서는 I κ B α 의 인산화가 일어나고 분해되면 NF- κ B subunit p65의 활성화가 유도된다고 알려져 있는데 브로콜리 유래 조다당 BCE-0를 농도별로 Raw 264.7 세포에 처리한 결과, BCE-0가 농도 의존적으로 I κ B의 분해를 유도하는 것을 확인하였으며, 동시에 p65의 인산화도 유도되는 것을 확인할 수 있었음(Fig. 54(b)).
- 대식세포에 존재하는 대표적인 신호 전달 단백질인 MAPK 및 NF- κ B에 대한 브로콜리 유래 효소 처리 조다당 BCE-0는 농도 의존적으로 인산화를 유도시킨다는 것을 위에서 확인하였으며, 핵 내의 전사인자에 대한 인산화를 확인하기 위해 AP-1 family의

대표적인 전사인자 중 하나인 cJun의 인산화를 확인한 결과, 농도 의존적으로 유도되는 것을 확인할 수 있었음(Fig. 54(c)).

- 위의 결과를 종합해 보면 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0는 MAPK 및 NF-κB signal pathway를 거쳐 핵 내로 들어가 AP-1 family의 대표적인 전사 인자 cJun을 활성화시켜 IL-6 및 NO의 생산을 유도한다고 최종 확인되었음.

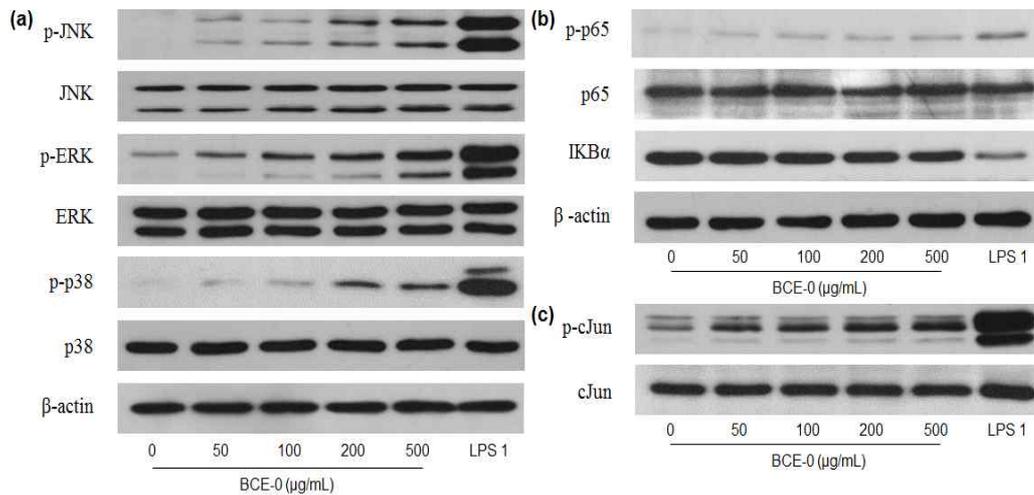


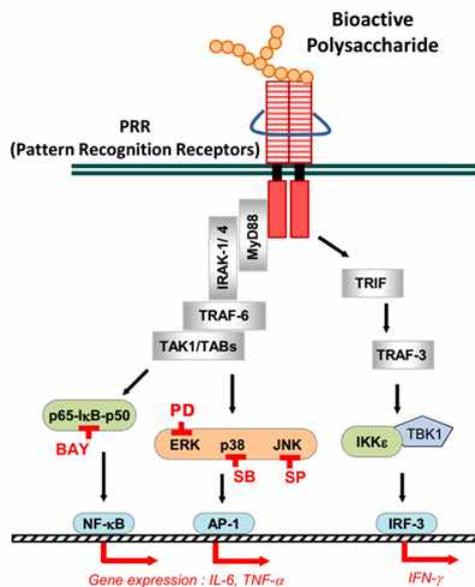
Fig 255. Activation of MAPK and NF-κB pathway by treatment of BCE-0 on Raw 264.7 murine macrophage cell line. Raw 264.7 macrophage cells (6×10^6 /6-cm dish) were treated with BCE-0 with various concentration for 30min (A). Whole cell lysate were immunoblotted with specific antibodies indicated on the left side of each panel. Whole cell lysates were prepared with Ripa buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.25% deoxycholate, 1% NP-40, 1mM EDTA) containing 1mM DTT, 1mM PMSF, 1mM sodium orthovanadate, 10mM β-glycerophosphate and protease inhibitor cocktail. Cell lysates were resolved by 10% SDS-PAGE and transferred to an Immobilon-P PVDF membrane (Millipore). The membrane was treated with 5% skim milk in TBS-T (TBS with 0.05% Tween 20) for 2hr and then probed with primary antibodies for overnight at 4°C. Antibodies were detected using horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit, anti-mouse, anti-goat IgG(Santa Cruz), and visualized with the ECL system (Amersham Biosciences). Antibody reactions were carried out in TBS-T. The specificity of antibody was confirmed by the molecular weight of the band detected using Precision plus protein standard(Bio-Rad, USA)

(나) Inhibitor를 통한 브로콜리 유래 조다당 BCE-0의 cytokine IL-6 및 NO 생산 경로 분석

- 브로콜리 유래 조다당 BCE-0에 의해 MAPK 및 NF-κB와 같은 세포내 신호전달 단

백질들의 인산화를 확인하였으므로, MAPK 및 NF- κ B의 specific inhibitor를 사용하여 BCE-0에 의한 IL-6 및 NO 생산 유도 기전을 분석하고자 하였음.

- SB203580는 p38의 하위 signaling을 억제하는 기능이 있는 inhibitor이며 SP600125는 JNK의 활성을 직접적으로 억제시키는 inhibitor로 알려져 있음. PD98059은 ERK의 상위 분자인 MEK1/2를 억제시킴으로서 ERK signaling을 억제하고, BAY11-7085는 NF- κ B를 비활성 상태로 존재시키는 I κ B α 의 인산화 억제제로서 NF- κ B signaling을 억제시키는 역할을 한다고 보고되어 있음(Fig. 55).



| Specific inhibitor | Target molecule |
|--------------------------------|-----------------------|
| SB203580 | p38 downstream |
| SP600125 (JNK Inhibitor II) | JNK |
| PD98059 | MEK1/2 |
| BAY11-7085 | I κ B α |

Fig 256. Specific inhibitors of signaling pathway molecule.

- 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0에 의한 cytokine 생산경로를 확인하기 위해 RAW 264.7 cell에 MAPK 및 NF κ B의 specific inhibitor를 30분 동안 처리한 후 500 μ g/mL의 BCE-0를 24시간 동안 처리하여 IL-6 및 NO의 생산량을 확인하였음.
- Fig. 56(A)에 나타난 바와 같이, BAY를 처리한 군에서 IL-6의 생산량이 현저히 줄어들음을 확인할 수 있었으며, 일부 SB, JNK inhibitor II를 처리한 군에서 IL-6의 생산량이 감소됨을 확인할 수 있었음. 이를 통하여 IL-6는 NF- κ B 경로를 주로 경유하여 IL-6를 생산하며, 일부 JNK, p38의 경로를 통하여 생산됨을 확인할 수 있었음.
- 반면, NO의 생산량을 확인한 결과(Fig. 56(B)), SB, JNK inhibitor II 및 BAY를 처리한 군에서 NO의 생산량이 감소함을 확인할 수 있었고, 이를 통하여 NO는 주로 p38, JNK 및 NF κ B 경로를 경유하여 생산함을 확인할 수 있었음.

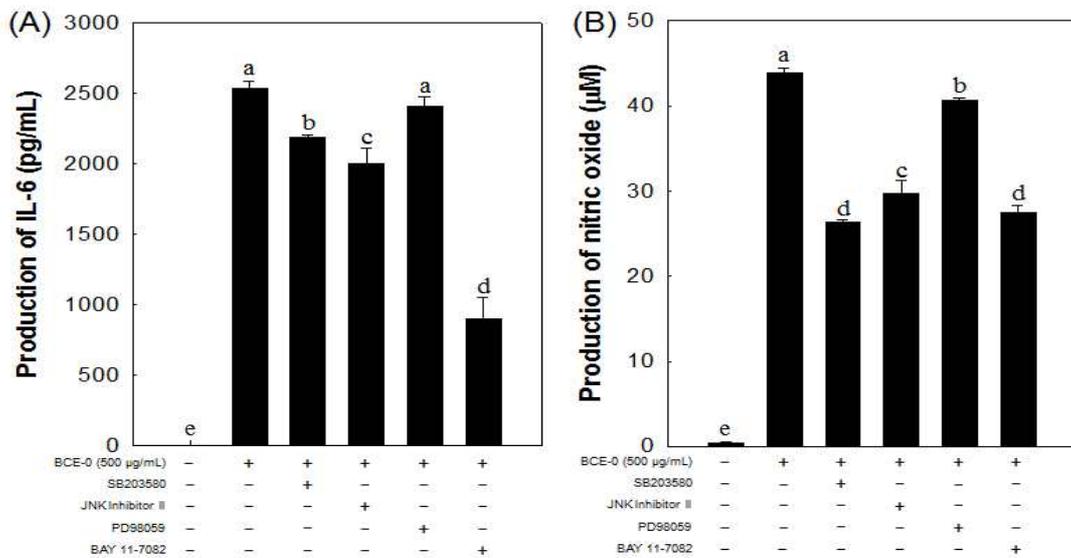


Fig 257. Effect of the treatment of BCE-0 and specific inhibitors by IL-6 (A) and NO production (B) in RAW 264.7 murine macrophage cell lines. RAW 264.7 cells (3.0×10^5 cells/well, 96-well plate) were pretreated with inhibitors (SB, SP and PD, 10 μ M; BAY, 2.5 μ M) for 30 min and then stimulated with BCE-0 (500 ug/mL) for 24 h. The concentrations of IL-6 and NO in the cultured medium were determined by mouse IL-6 ELISA kit and Griess reagent system. Means with different superscript letters (a-e) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

- 앞선 결과를 바탕으로, inhibitor를 통하여 각 경로별 활성 단백질의 저해를 확인하기 위해, RAW 264.7 cell에 MAPK 및 NF κ B의 specific inhibitor를 1시간 동안 처리한 후 500 μ g/mL의 BCE-0를 30분 동안 처리하여 시료를 조제한 후, 이를 western blot을 통하여 단백질 수준에서 확인한 결과(Fig. 57), IL-6와 NO를 주로 생성했던 경로인 NF κ B, p38, JNK경로를 저해한 군에 대하여 I κ B α 는 control 대비 증가함을 확인하여 NF κ B 경로의 활성을 저해함을 확인하였고, 또 다른 NF κ B 경로 인산화 단백질인 p-p65를 확인한 결과, control 대비 감소한 것을 확인할 수 있었음. JNK와 p38을 저해한 군에 대하여 인산화 단백질인 p-JNK와 p-p38은 control 대비 감소한 것을 확인하여 MAP kinase경로 중 JNK와 p38의 경로를 저해함을 재차 확인할 수 있었음.
- 결론적으로, IL-6와 NO의 생산량 확인과 western blot 확인을 통하여 대식세포에 대하여 BCE-0를 처리하였을 때, IL-6는 주로 NF- κ B경로를 통하여 생산되어 지며, chemokine인 NO의 경우 p38, JNK, NF κ B의 경로를 통하여 생산되어 체내의 면역계를 활성화시킴을 최종 확인할 수 있었음.

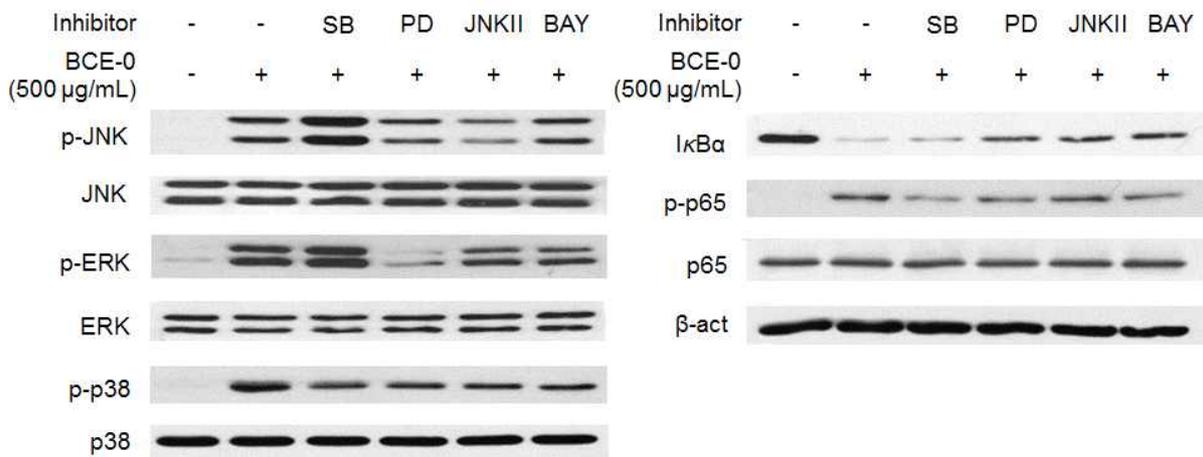


Fig 258. Effect of specific inhibitors of MAP kinase pathways on BCE-0 -induced phosphorylation in RAW 264.7 cell lines. RAW 264.7 cells (3.0×10^6 cells/6 cm dish) were pretreated with SB203580 (10 μ M), JNK inhibitor II (10 μ M), BAY11-7082 (5 μ M) for 1 h and the stimulated with BCE-0 (500 μ g/mL) for 30 min in 6 cm dish. Whole-cell lysates were immunoblotted with the specific antibodies indicated. β -actin served as an internal loading control.

(다) Macrophage receptor blocking antibodies를 통한 브로콜리 유래 조다당 BCE-0의 cytokine IL-6 및 NO 생산 경로 분석

○ 식물 다당에 의한 대식세포 활성화는 대식세포의 특이 수용체(specific receptor)에 다당 분자가 인식.(recognition)되면서 매개된다고 생각되어짐. 이들 수용체는 pattern recognition 분자로 알려진 세포막결합 단백질로 면역반응 초기에 외부에서 들어온 ligand를 인식할 수 있는 분자이며, 특히 macrophage는 toll-like receptor 4(TLR4), CD14, complement receptor 3(CR3; CD11b/CD18, Mac-1 또는 α M β 2 integrin으로 알려져 있기도 함), scavenger receptor (SR), dectin-1 및 mannose receptor (MR)를 경유하여 식물 기원의 다당 또는 당단백질과 결합이 가능함. 이들 수용체의 활성화는 일련의 연속된 세포내 신호전달을 유도하고 결과적으로 핵 내에서 특정 유전자의 전사의 활성화 및 염증성 cytokine의 생산 등으로 이어지게 됨.

○ 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0에 의한 macrophage receptor 경로를 확인하기 위해 RAW 264.7 cell에 specific receptors (TLR2, TLR4, Dectin1, CR3, CD14, MR, SR)를 1 시간 동안 처리한 후 500 μ g/mL의 BCE-0를 24시간 동안 처리하여 IL-6 및 NO의 생산량을 확인하였음.

○ Fig. 58에 나타난 바와 같이, TLR4, Dectin1, SR을 처리한 군에서 NO의 생산량이 현

저히 감소됨을 확인 할 수 있었으며, 일부 TLR2와 CD14을 처리한 군에서 IL-6의 생산량이 감소됨을 확인할 수 있었음. 이를 통하여 NO는 주로 TLR4, Dectin1, SR을 경유하여 핵내로 들어가 생산됨을 확인할 수 있었음.

○ 반면, IL-6의 생산량을 확인한 결과(Fig. 59), SR을 처리한 군에서 IL-6의 생산량이 감소함을 확인 할 수 있었고, 이를 통하여 IL-6는 주로 SR을 경유하여 핵내로 들어가 생산됨을 확인할 수 있었음.

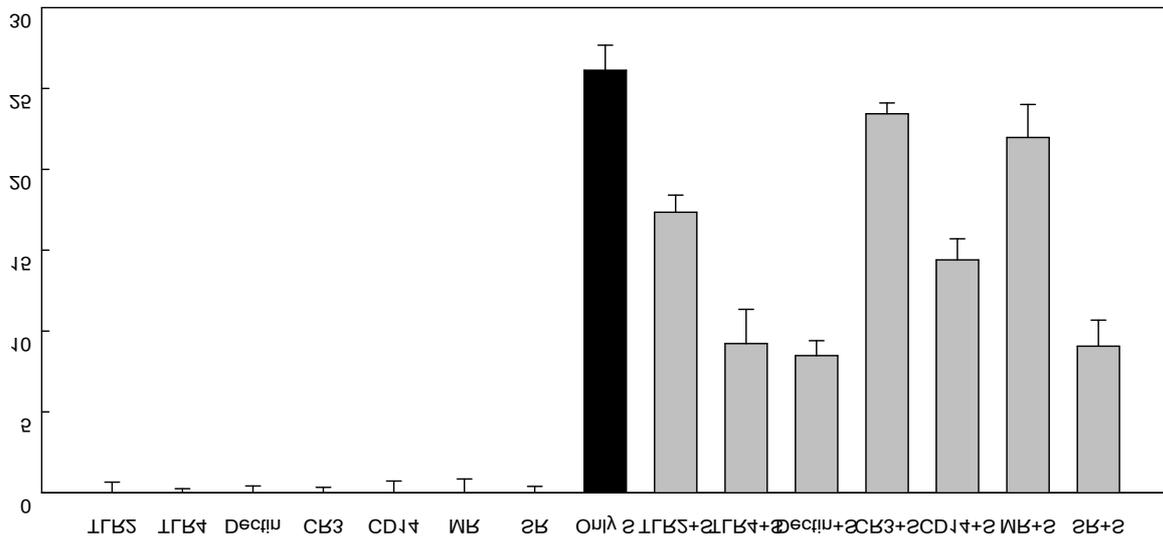


Fig 259. Effect of anti-PRR antibodies on NO production in BCE-0-activated RAW 264.7 cell lines.

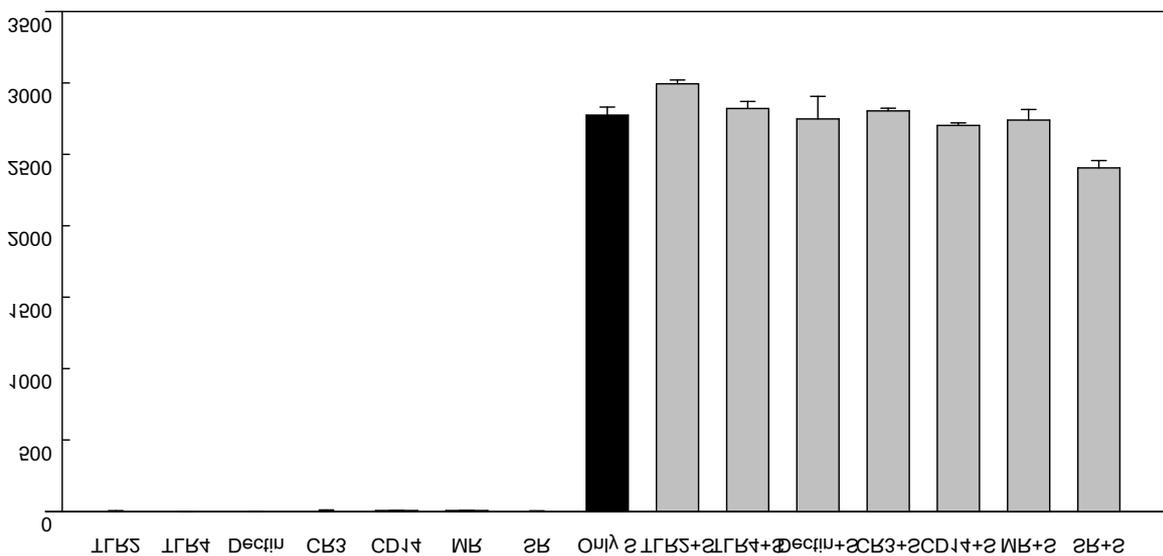


Fig 260. Effect of anti-PRR antibodies on IL-6 production in BCE-0-activated RAW 264.7 cell lines.

- 브로콜리 유래 조다당 BCE-0의 대식세포 활성화 기전 분석 결과를 모두 종합해 보면, Fig. 60 및 Fig. 61과 같은 결론을 지을 수 있음.
- 브로콜리 유래 조다당 BCE-0에 의해 활성화된 대식세포는 dectin1, TLR4 또는 SR 수용체를 경유하여 p38 및 JNK와 NF- κ B pathway를 거쳐 핵 내로 들어가 NO를 생산한다고 최종 결론지었음 (Fig. 60).
- 브로콜리 유래 조다당 BCE-0에 의해 활성화된 대식세포는 SR 수용체를 경유하여 NF- κ B pathway를 거쳐 핵 내로 들어가 IL-6를 생산한다고 최종 결론지었음 (Fig. 61).

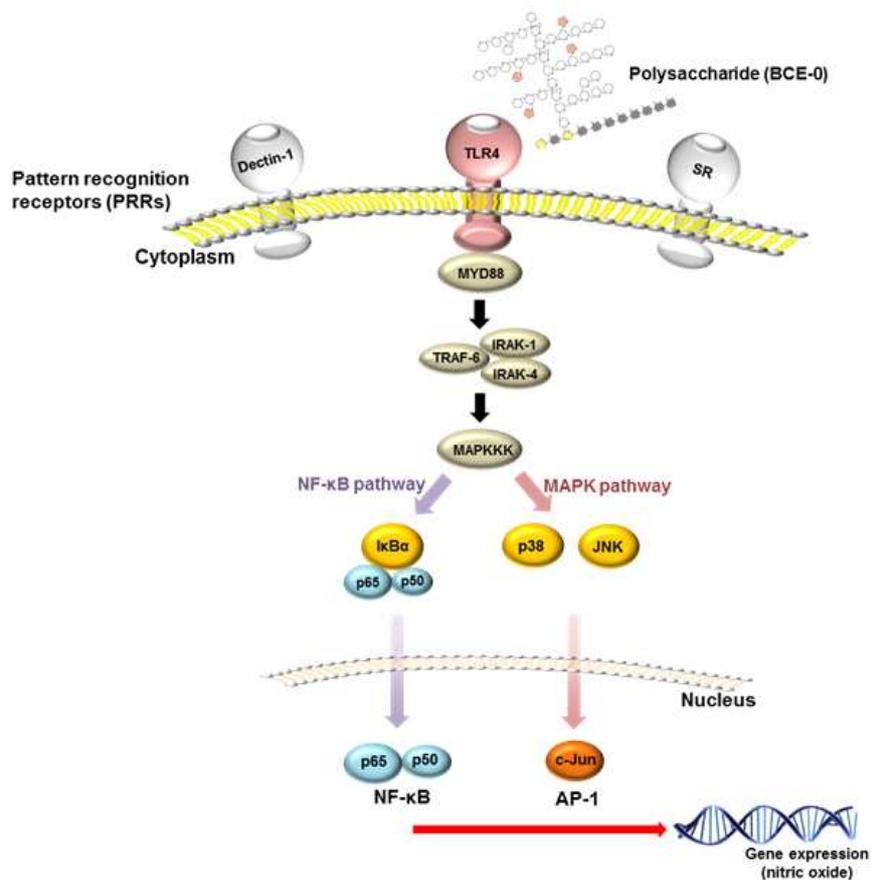


Fig 261. A proposed NO signal pathway mechanism of BCE-0 activating macrophages.

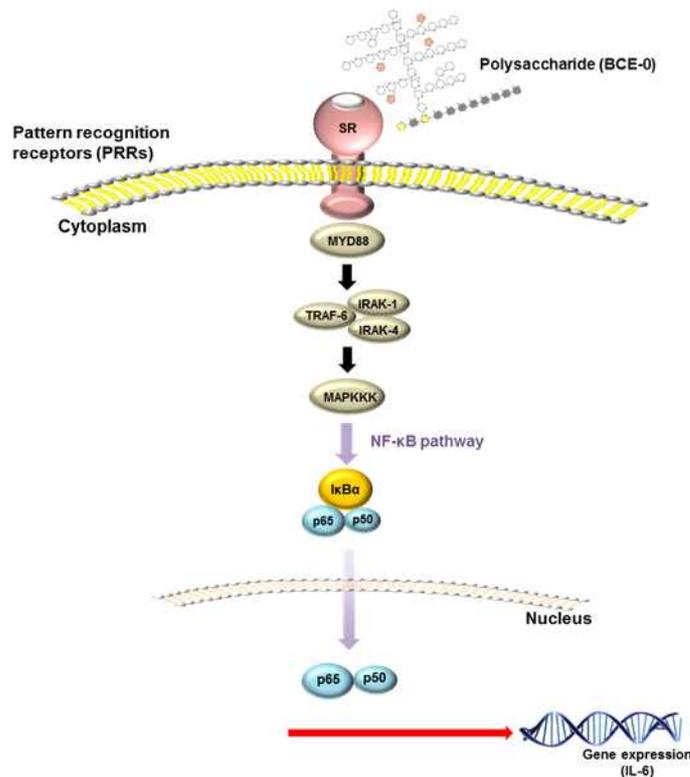


Fig 262. A proposed IL-6 signal pathway mechanism of BCE-0 activating macrophages.

사. 브로콜리 유래 면역활성 다당 BCE-I의 구조 규명 및 활성부위(active moiety) 평가

- 앞선 결과를 바탕으로 브로콜리로부터 분리한 조다당 BCE-0는 우수한 면역활성 및 항암활성을 나타내었으며, 정제를 통해 정제 획분 BCE-I, -II 및 -III를 얻어 정맥주사 및 경구투여를 통한 항전이 효과를 확인한 결과, 주로 BCE-I이 브로콜리의 생리활성에 기여하는 활성분체라고 결론지었음.
- 따라서 본 연구진은 브로콜리의 생리활성에 기여하는 주요 활성 분체인 BCE-I의 구조를 규명하고자 구조 분석을 진행하였음.
- 앞의 4.2. 브로콜리 유래 효소처리 다당 획분의 일반화학적 특성에서 언급하였듯이 브로콜리 유래 효소처리 정제다당 BCE-I의 일반화학적 특성(Table 91)은 중성당 74.3%, 산성당 18.2%, 단백질 7.2%, Kdo 0.3%로 이루어져 있었으며, 주로 galactose (53.5%), galacturonic acid (17.9%), arabinose (13.0%)로 구성되어 있는 50 kDa의 분자량을 가진 정제도가 우수한 다당임을 보여주었음(Fig. 31(B)). 또한, rhamnose, arabinose 및 galactose가 주로 존재하는 것으로 보아 rhamnose 및 galacturonic acid를 주쇄로 한

pectin 유래 rhamnogalacturonan I (RG-I) 구조일 것으로 추정되며, 특히 arabinose와 galactose의 높은 조성을 고려할 때, RG-I 구조내의 arabinogalactan이 높은 비율로 존재할 것이라고 추정되었음.

(1) 브로콜리 유래 효소처리 정제 획분 BCE-I과 β -glucosyl Yariv reagent와의 반응성 검토

- 브로콜리 유래 효소처리 정제 획분 BCE-I은 앞서 구성당 분석을 통해 RG-I의 구조임을 추정하였고, 특히 arabinose와 galactose의 비율이 높은 것으로 보아 아마 arabinogalactan 구조가 풍부하게 존재함을 추정케 하였음.
- 식물체에 존재하는 arabinogalactan은 Clarke 등의 분류에서 type I, II, III로 존재한다고 보고되어 있으며, type I의 경우 β -1,4, type, type II의 경우 β -1,3 결합의 주쇄에 β -1,6 결합의 side chain이 분지되며 그 말단에 arabinose가 α 결합으로 연결되어 있다고 알려져 있음. 따라서 BCE-I의 구조가 arabinogalactan 구조의 I형인지, II형인지 확인하기 위해 type II arabinogalactan의 선택적 발색 시약인 glucosyl Yariv reagent와의 반응성을 검토하고자 하였음.
- β -Glucosyl Yariv reagent는 type II arabinogalactan인 arabino- β -3,6-galactan과 특이적으로 반응하여 적색 침전을 형성한다고 알려져 있음. 이를 확인하기 위해 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0와 정제획분 BCE-I, BCE-II, BCE-III에 대하여 single radical gel diffusion을 진행하였음(Fig. 62).
- Arabino- β -3,6-galactan의 표준물질인 gum arabic을 농도별로 제조하여 확인한 결과, 환 생성능에 있어 BCE-II와 BCE-III에 대하여는 고농도에서도 환 생성능이 나타나지 않았음.
- 그러나 BCE-I의 경우 환 생성능에 있어 농도 의존적으로 환 크기가 증가함을 확인할 수 있었으며, arabinogalactan이 존재할 것으로 추정되어지는 BCE-0와 BCE-I의 경우, 표준물질인 gum arabic 1,000 μ g/mL 농도에서 생성된 환 크기를 100%라 가정하였을 때, BCE-0은 14.9%로 나타난 반면, BCE-I은 83.4%의 높은 비율로 arabino- β -3,6-galactan이 존재함을 확인할 수 있었음. 이는 아마 주쇄를 제외하고 side chain 대부분이 type II arabinogalactan인 arabino- β -3,6-galactan으로만 존재할 것이라 예상되었음(Fig.62).

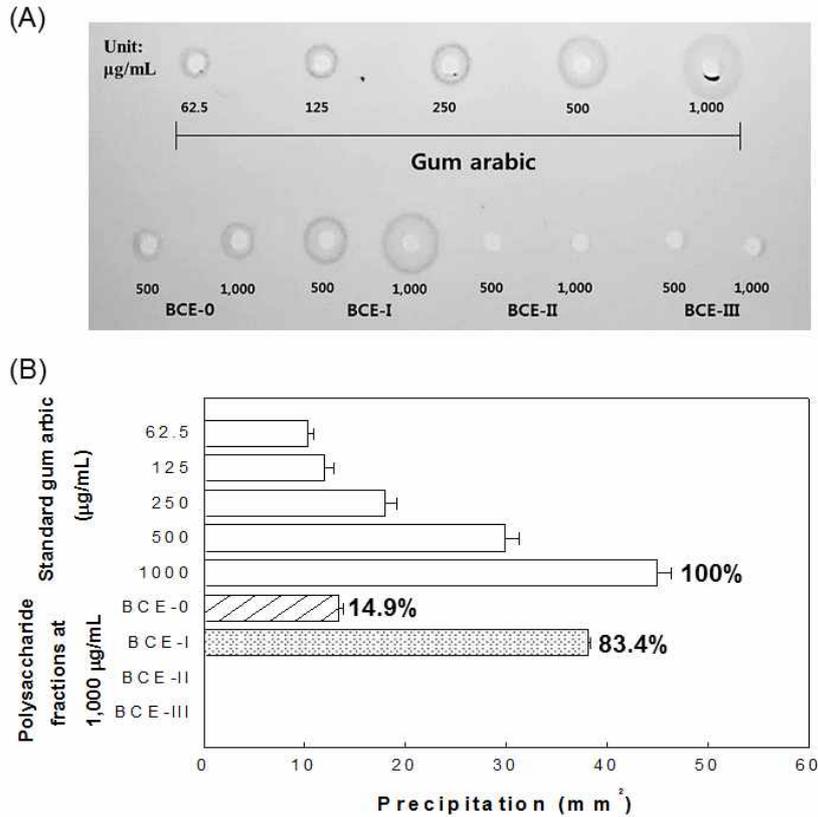


Fig 263. Single radial gel diffusion (A) and reactivity (B) between β - glucosyl Yariv reagent and polysaccharide fractions isolated from broccoli.

(2) Methylation analysis에 의한 BCE-I 결합양식 확인

- 다당의 구조 분석에 있어서 당쇄의 결합양식은 다당체의 기본 구조를 해명한다는 점에서 가장 중요한 분석으로 알려져 있음. 핵산 및 단백질의 구성분자인 nucleotide나 amino acid의 사이에 phosphodiester 결합이나 peptide 결합(amide 결합)이라는 동일한 결합양식으로 연결된 데 반하여, 다당은 구성당 사이에 1→2, 1→3, 1→4, 1→6 등의 결합이 가능하며 각 구성당 탄소에서 분지된 형태로 존재할 수 있기 때문에 타 생체 분자에 비해 구조 해석이 어려우며 따라서 결합양식의 분석은 다당의 구조 특성 규명에 있어 가장 중요한 step이라고 할 수 있음.
- 당쇄 결합양식 분석에 많이 사용되는 methylation analysis는 결합에 참여하지 않은 탄소에 붙은 hydroxyl를 methyl화하고, 가수분해하여 부분적으로 methyl화 된 구성당의 ring을 개환한 후, 남아있는 hydroxyl를 acetylation하여 GC-MS를 이용, fragment ion을 분석하여 구조를 규명하는 복잡한 과정임 (Fig, 63).
- 브로콜리 유래 면역활성의 주요 활성분체 BCE-I의 전체 구조를 추정하기 위해 당쇄

결합양식을 methylation analysis를 이용하여 확인하였음. BCE-I은 이미 앞선 결과에서 구성당 분석과 Yariv reagent 반응을 통하여 galactose와 arabinose가 풍부한 type II arabinogalactan으로 존재할 가능성을 예측하였으며, 이를 바탕으로 methylation analysis를 진행하여 GC-MS를 통해 total ion chromatogram와 각 peak의 fragment ion을 확인하였음(Fig. 64 및 65).

- 그 결과, arabinose, rhamnose 및 galactose 총 3종의 구성당이 결합에 참여함을 확인할 수 있었으며, 특히 6-linked galactose (25.2%)와 3,6-linked galactose (18.1%)가 많이 존재함을 확인할 수 있었고, terminal galactose (10.0%), terminal arabinose(♯) (5.9%)도 일부 검출되었음 (Table 92).
- 이를 통하여 브로콜리 유래 면역활성 다당체 BCE-I은 3-linked와 3,6-linked로 연결된 galactose가 다량 존재하는 것으로 보아 1→3 결합과 1→6 결합이 고도로 분지되었으며, 말단에 galactose와 arabinose로 구성된 type II arabino-β-3,6-galactan 임을 재차 확인할 수 있었으며, 이를 종합하여 예상 구조를 모식화하였음(Fig, 66).

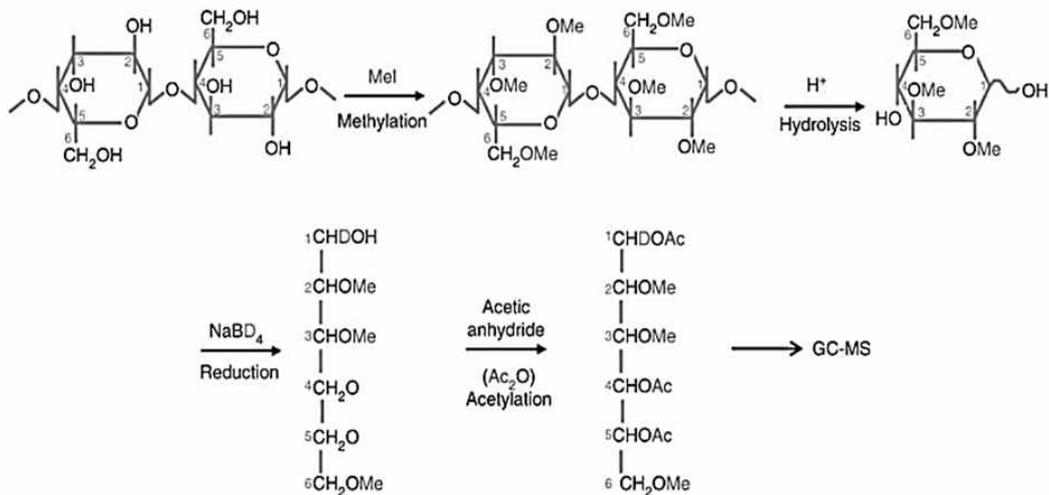


Fig 264. Principle of methylation analysis for determination of sugar linkages of polysaccharides.

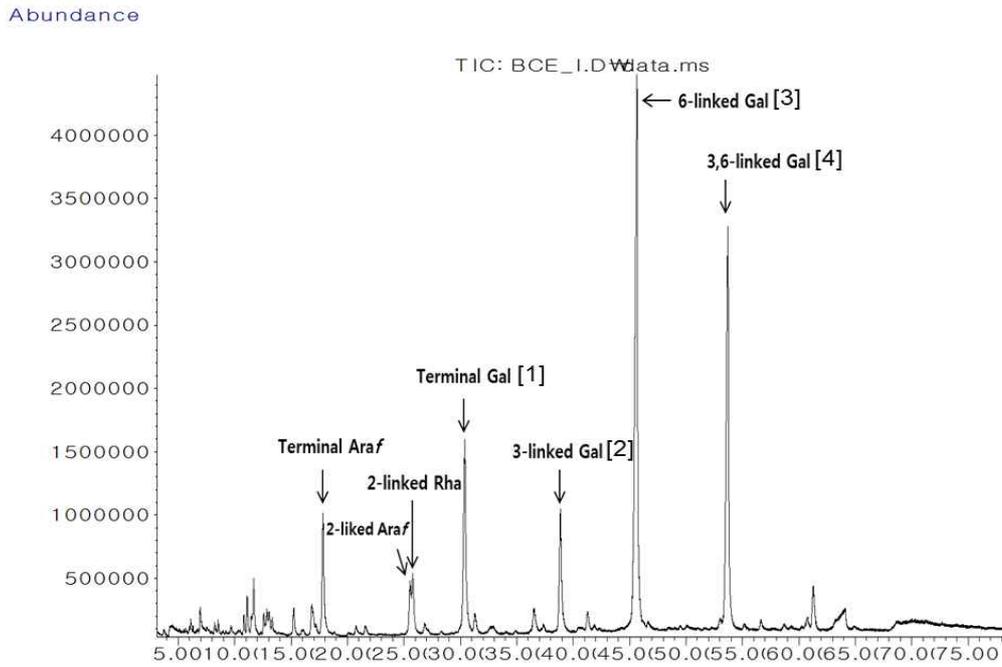


Fig 265. Total ion chromatograms of GC-MS for partially methylated alditol acetates of BCE-I purified from BCE-0.

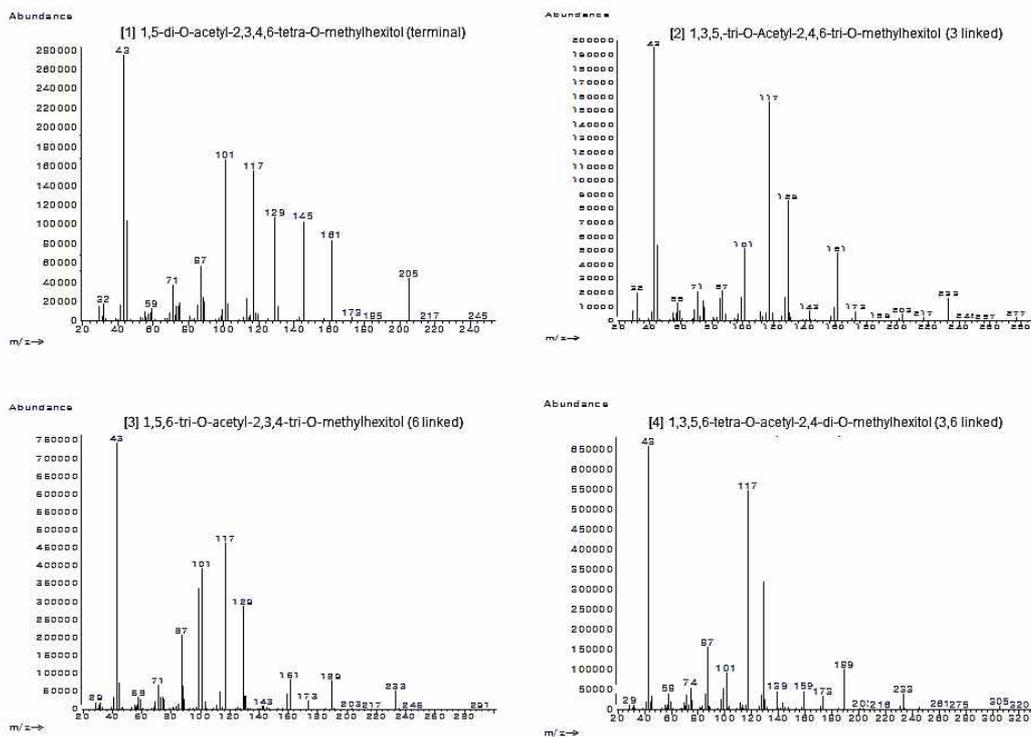


Fig 266. Main GC-MS fragment ion patterns of the characteristic linkages derived from BCE-I

Table 92. Glycosidic linkage analysis of BCE-I purified from broccoli

| Glycosyl residue | Glycosidic linkage | neutral mole% |
|------------------|---------------------|---------------|
| Ara | Terminal(β) | 5.9 |
| | Terminal(p) | 0.4 |
| | 2-(β) | 2.2 |
| | 5-(β) | 1.1 |
| Rhamnose | Terminal | 0.3 |
| | 2- | 2.3 |
| | 2,4- | 1.3 |
| Gal | Terminal | 0.6 |
| | Terminal | 10.0 |
| | 3- | 5.1 |
| | 4- | 0.7 |
| | 6- | 25.2 |
| | 3,6- | 18.1 |
| | 3,4,6- | 0.4 |
| | 2,3,4,6- | 0.7 |

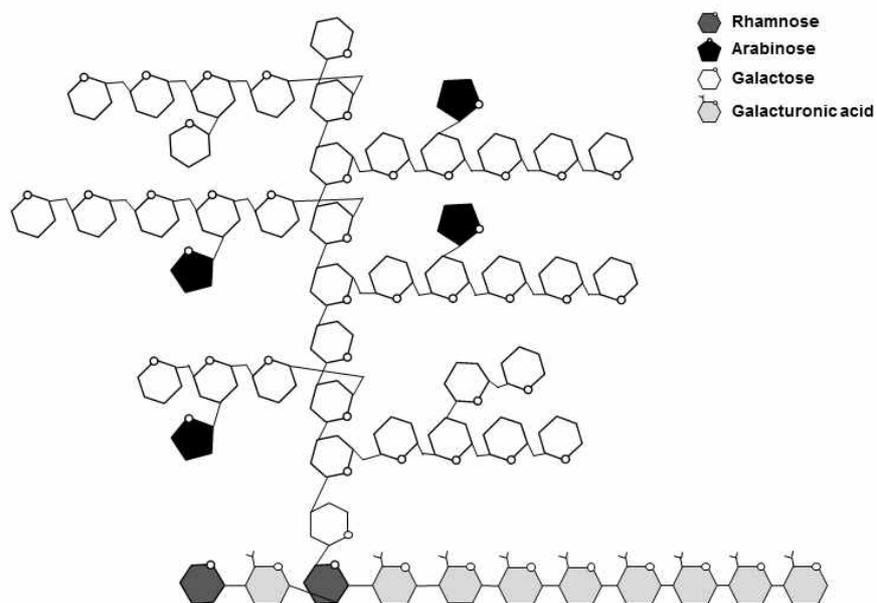


Fig 267. A possible micro-structure of immunostimulating polysaccharide, BCE-I from broccoli.

(3) BCE-I의 미세구조 해명을 위한 연속적 효소처리 및 특성 분석

(가) BCE-I의 구조분석을 위한 연속적 효소처리에 의한 단편화 및 단편획분의 정제

- 다당은 고분자의 특성에 기인하여 전체구조를 한 번에 분석할 수 있는 방법이 개발되어 있지 않으므로, 화학적 또는 효소처리에 의해 단편을 조제하고 각 단편의 미세구조를 규명하여 최종적으로 전체 구조를 추정하는 것이 일반적임.
- 따라서 본 연구에서는 브로콜리 유래 면역활성 다당 BCE-I을 각종 효소를 처리하여 단편화하고 이들을 분석하고자 하였음. Methylation analysis 결과로부터 BCE-I 다당에는 상당량의 type II arabino- β -3,6-galactan이 존재함을 예측할 수 있었으므로 우선 측쇄 부분의 비환원 말단 잔기를 제거할 목적으로 Exo- α -L-arabinofucarosidase(from *A. niger*)(E-AFASE), exo- α (1-2,3,4,6)-L-fucosidase(from *Homo sapiens*)(E-FUCHS) 및 exo- α -D-glucuronidase(from *Geobacillus stearothermophilus*)를 각 효소의 최적 조건에 맞게 처리하고 Superdex 75 GL column이 장착된 HPLC를 이용하여 분획, 분자량 및 구성 성분이 상이한 2개의 단편획분 BCE-I-1a와 BCE-I-1b를 획득하였음 (Fig. 4).
- 첫 번째 효소처리를 통해 얻어진 고분자 획분 BCE-I-1a는 다시 arabino- β -3,6-galactan의 주쇄인 β -1,3 결합의 galactose를 specific하게 가수분해하는 galactan-1,3- β -galactosidase(from *Clostridium thermocellus*)를 최적 조건에 맞게 처리하고 Superdex 75 GL column이 장착된 HPLC를 이용하여 분획, 분자량 및 구성 성분이 상이한 3개의 단편획분 BCE-I-2a, -2b 및 -2c를 얻었음 (Fig. 4).

(나) 단편획분과 β -Glucosyl Yariv reagent와의 반응성 검토

- 브로콜리 유래 효소처리 정제 획분 BCE-I은 앞서 구성당 분석 및 당쇄 결합양식 분석을 통해 side chain 대부분이 type II arabinogalactan인 arabino- β -3,6-galactan으로 존재하는 RG-I의 구조임을 예측하였음. 이후 두 단계의 연속적인 효소처리를 통해 단편획분 BCE-I-1a, 1b, 2a, 2b 및 2c 총 5개를 얻었으며 이들 활성부위의 구조 특성과 함량 등을 명확히 하기 위해 β -Glucosyl Yariv reagent와의 반응성을 검토하였음.
- β -Glucosyl Yariv reagent는 type II arabinogalactan인 arabino- β -3,6-galactan과 특이적으로 반응하여 적색 침전을 형성한다고 알려져 있으며 이는 특정 구조의 다당과 특이적으로 반응하는 유일한 발색 시약으로 알려져 있으므로 이를 이용, 브로콜리 유래 효소처리 조다당 BCE-0와 정제획분 BCE-I, BCE-II, BCE-III에 대하여 single radical gel diffusion을 행하였음(Fig. 67).
- 그 결과, 표준 arabino- β -3,6-galactan인 gum arabic은 농도 의존적으로 침전환이 증

가하는 양상을 보여 주었으며, BCE-I의 경우 표준 물질의 약 80%에 해당하는 침전환 형성이 관찰되었음(Fig. 67). 또한, 브로콜리 유래 BCE-I을 *exo- α -L-arabinofucarosidase*, *exo- α (1-2,3,4,6)-L-fucosidase* 및 *exo- α -D-glucuronidase* 처리하여 얻어진 고분자 획분 BCE-I-1a의 경우 *arabino- β -3,6-galactan*의 비환원 말단에 결합되어 있다고 알려진 *arabinose*, *fucose*, *glucuronic acid*를 제거함으로써 침전환의 크기가 표준물질 gum arabic 1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에 준하는 유사한 침전환 크기를 나타내었음. 이는 최초 BCE-I 중 존재하는 *arabino- β -3,6-galactan*의 양에 비해 *exo- α -L-arabinofucarosidase*, *exo- α (1-2,3,4,6)-L-fucosidase* 및 *exo- α -D-glucuronidase* 처리시 약 20% 증가된 함량이었음.

- 한편 *exo- α -L-arabinofucarosidase*, *exo- α (1-2,3,4,6)-L-fucosidase* 및 *exo- α -D-glucuronidase* 처리하여 얻어진 저분자 획분 BCE-I-1b, BCE-I-1a를 *galactan-1,3- β -galactosidase*로 재차 처리하여 얻어진 획분 BCE-I-2a, 2b와 2c와의 반응에서는 어떠한 침전환도 관찰되지 않은 것으로 보아, *galactan-1,3- β -galactosidase* 효소처리에 의해 *arabino- β -3,6-galactan*의 β -1,3 결합이 분해되면서 반응성이 나타나지 않는 것으로 확인되어 효소처리가 비교적 잘 진행된 것으로 예측하였음 (Fig. 67).

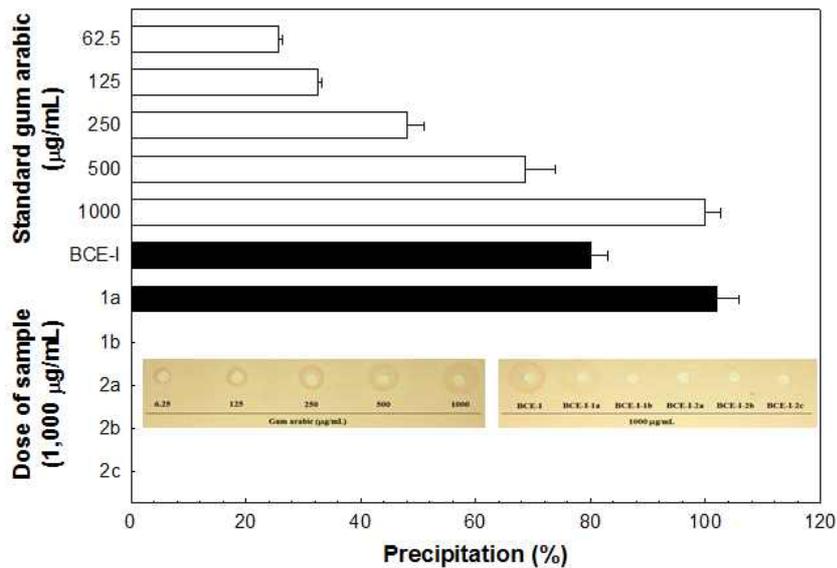


Fig 268. Single radial gel diffusion and reactivity of BCE-I and its subfractions with β -glucosyl Yariv reagent

(다) 단편획분의 구성당 분석

- 브로콜리 유래 효소처리 정제획분 BCE-I으로부터 연속적인 효소처리를 진행하여 얻은 총 5종의 단편획분에 대한 구성당 분석을 진행하기 위해 기존에 alditol acetate 유도체화하여 GC로 분석하는 방법보다 HPLC를 이용하여 전처리도 간단하며, 중성당 7종 외에 산성당 2종까지 한번에 분석가능한 방법을 찾아 적용시켜 보았음.
- 다당 시료를 2M TFA로 가수분해한 후, 알칼리상태에서 환원말단에 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone(PMP)을 붙여 DIW와 chloroform을 이용하여 상분리한 후, aqueous layer을 회수하여 filtration을 거쳐 0.1M phosphate buffer(pH 6.7):acetonitrile=82:18의 용매로 평형화된 Acclaim C18 column이 장착된 HPLC를 이용하여 254 nm에서 측정하였음.
- 그 결과, Table 93에서 보는 바와 같이, 브로콜리 유래 면역활성 다당 BCE-I의 경우 arabino- β -3,6-galactan의 side chain을 가진 RG-I의 구조로 예상된 바, 이에 상응하게 73.6% galactose와 12.4%의 arabinose가 주로 구성되어 있었으며, rhamnose와 galacturonic acid가 각각 6.1%, 5.5%로 비슷한 비율로 차지하고 있다는 것이 확인되었음.
- BCE-I을 exo- α -L-arabinofucosidase, exo- α (1-2,3,4,6)-L-fucosidase 및 exo- α -D-glucuronidase 처리하여 얻은 저분자 획분 BCE-I-1b의 구성당을 확인한 결과, 주로 galactose(83.6%)와 arabinose(11.8%)로 이루어진 것으로 보아 arabino- β -3,6-galactan의 비환원말단에 존재하는 galactose와 arabinose가 가수분해 되어 저분자 획분에서 검출된 것이라 사료되었음.
- BCE-I-1a를 galactan-1,3- β -galactosidase 재처리하여 얻은 단편획분 BCE-I-2b와 2c 구성당을 측정한 결과 두 시료 모두 90% 이상의 galactose가 검출된 것으로 보아 arabino- β -3,6-galactan의 주쇄인 β -1,3 결합이 가수분해되어 저분자 획분으로 검출된 것이라 사료되었음.
- 또한 BCE-I-2b의 경우 1.3%의 glucuronic acid가 검출되었는데 이는 아마 첫 번째 효소처리에서 가수분해 되지 않은 glucuronic acid가 검출되어 나타난 것으로 예측되었음.
- 위의 구성당 결과를 종합해 볼 때, 앞서 실행한 구성당 분석과 당쇄결합양식 분석을 바탕으로 예상 구조를 모식화하고 이들을 효소처리하여 단편획분으로 조제하여 분석한 결과 BCE-I은 arabino- β -3,6-galactan의 구조임을 다시 한번 확인하였음.

Table 93. Sugar composition of BCE-I and its subfractions derived by sequential enzymatic degradation

| Component sugar | Mole % | | | | | |
|-------------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | BCE-I | BCE-I-1 a | BCE-I-1 b | BCE-I-2 a | BCE-I-2 b | BCE-I-2 c |
| Mannose | 1.7 | 2.1 | - | 3.4 | - | - |
| Rhamnose | 6.1 | 6.6 | 4.6 | 10.8 | 4.5 | - |
| Glucuronic acid | 0.8 | 0.9 | - | - | 1.3 | - |
| Galacturonic acid | 5.5 | 6.8 | - | 15.5 | - | - |
| Glucose | - | - | - | - | - | - |
| Galactose | 73.6 | 72.1 | 83.6 | 43.3 | 93.2 | 100.0 |
| Xylose | - | - | - | - | - | - |
| Arabinose | 12.4 | 11.6 | 11.8 | 27.0 | 1.0 | - |
| Fucose | - | - | - | - | - | - |

(라) 단편획분의 구조 및 결합위치 결정

- 브로콜리 유래 면역활성의 주요 활성본체 BCE-I은 이미 앞에서 methylation analysis를 통해 3-linked와 3,6-linked로 연결된 galactose가 다량 존재하는 것으로 보아 1→3 결합과 1→6 결합이 고도로 분지되었으며, 말단에 galactose, arabinose 및 glucuronic acid가 존재하는 type II arabino-β-3,6-galactan임을 추정하였음 (Table 94). 이를 바탕으로 BCE-I의 미세구조를 규명하기 위해 연속적인 효소처리로 얻은 단편획분 BCE-I-1a~2c의 당쇄 결합양식을 methylation analysis를 이용하여 최종 구조를 확인하고자 함.
- 그 결과는 Table 9에서 보는 바와 같이 arabino-β-3,6-galactan의 비환원말단에 존재하는 galactose, arabinose, glucuronic acid를 제거할 목적으로 사용된 exo-α-L-arabinofucosidase, exo-α(1-2,3,4,6)-L-fucosidase 및 exo-α-D-glucuronidase 효소를 처리하고 얻은 단편획분 BCE-I-1b의 경우 arabinose만이 검출되어 구성당과는 상이한 결과가 나타났는데 이는 아마 methylation analysis 과정 중 파괴되거나 효소처리에 의해 가수분해된 당 자체가 monomer형태로 존재하다보니 그 양이 미미하여 검출한계가 나타난 것으로 보임.
- 반면 BCE-I-1a에 galactan-1,3-β-galactosidase 재처리하여 얻은 단편획분 BCE-I-2b와 2c의 경우 terminal-과 6-linked로 주로 구성된 것으로 보아 arabino-β-3,6-galactan의 주쇄부분인 β-1,3 galactan 결합이 절단되면서 branch 부분에 존재하는 β-1,6 결합의 galactose가 검출된 것이라 확인되었음.

○ 위의 methylation analysis 결과를 종합해 보면, 비환원 말단에 galactose, arabinose, glucuronic acid가 결합되어 있는 arabino- β -3,6-galactan의 구조임을 최종 확인하였음.

Table 94. Methylation analysis of BCE-I and its subfractions derived by sequential degradation

| Glycosyl residue | Deduced Glycosidic linkage | Mole % | | | | | |
|------------------|----------------------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | BCE-I | BCE-I-1 a | BCE-I-1 b | BCE-I-2 a | BCE-I-2 b | BCE-I-2 c |
| Arabinose | Terminal(f) | 7.9 | 6.6 | 14.3 | - | 1.4 | - |
| | Terminal(p) | 0.5 | 0.8 | 85.7 | - | 0.6 | - |
| | 2-(f) | 3.0 | - | - | 16.1 | - | - |
| | 5-(f) | 1.5 | - | - | - | - | - |
| Rhamnose | Terminal | 0.4 | 1.0 | - | - | - | - |
| | 2- | 3.1 | - | - | 6.0 | - | - |
| | 2,4- | 1.7 | 2.4 | - | 6.5 | - | - |
| Mannose | Terminal | 0.8 | 1.5 | - | - | - | - |
| Galactose | Terminal | 13.5 | 19.8 | - | 26.8 | 20.7 | 49.5 |
| | 3- | 6.9 | - | - | 1.8 | 0.6 | - |
| | 4- | 0.9 | - | - | - | - | - |
| | 6- | 33.9 | 42.8 | - | 38.6 | 74.0 | 50.5 |
| | 3,6- | 24.4 | 25.1 | - | 4.2 | 2.8 | - |
| | 3,4,6- | 0.5 | - | - | - | - | - |
| | 2,3,4,6- | 0.9 | - | - | - | - | - |

(마) 연속적인 효소 가수분해로 얻어진 단편획분의 구조분석

① Procedure I 과정에 의해 획득한 BCE-I-1b의 단편 서열 분석

○ BCE-I-1b 단편에 대한 상세 구조분석을 위해 negative-ion Q-TOF를 이용한 분석을 행하였음(Fig. 68). $[M+H]^-$ 형태의 arabinose (m/z 149), galactose (m/z 179), glucuronic acid (m/z 193) 및 4-methyl-glucuronic acid (m/z 207)이 각각 확인되었음.

○ 이로써 BCE-I-1b는 arabino- β -3,6-galactan 비환원 말단에 fucose를 제외하고 arabinose, galactose, glucuronic acid, fucose 단당이 존재하고 있음이 확인되었음. 이

결과는 위의 구성당 및 당쇄결합양식 분석 결과와 상응하였으며, glucuronic acid나 galactose의 경우 전처리 과정에 의해 파괴되어 검출이 안된 경우도 있지만 전처리 과정이 없는 Q-TOF 결과를 통해 비환원 말단에 존재한다는 것이 최종 확인되었음.

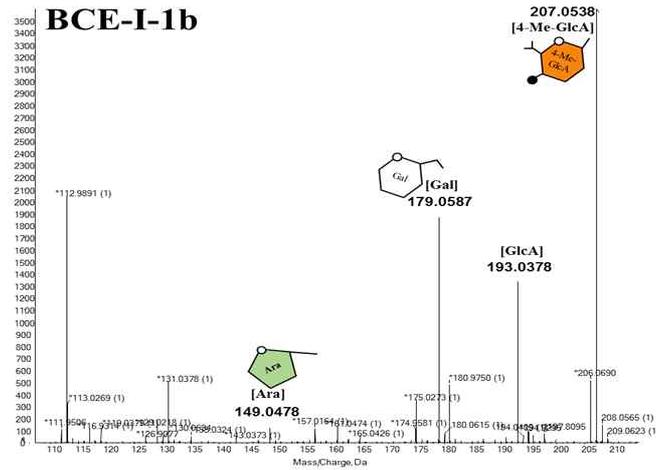


Fig 269. Negative-ion mass spectrum of BCE-I-1b using Q-TOF/MS.

② Procedure II 과정에 의해 획득한 BCE-I-2b와 -2c의 단편 서열 분석

㉞ BCE-I-2b 단편의 서열분석을 위한 Q-TOF 분석

○ BCE-I-2b 단편에 대한 상세 구조분석을 위해 negative-ion Q-TOF를 이용한 분석을 행하였음(Fig. 69(A)). $[M+H]^-$ 형태의 galactose만으로 이루어진 $[Gal_2]$ 의 disaccharide (m/z 341), $[Gal_3]$ 의 trisaccharide (m/z 503), $[Gal_4]$ 의 tetrasaccharide (m/z 665)가 관찰되었으며, 4-Me-GlcA+Gal로 이루어진 $[4-Me-GlcA+Gal]$ 의 disaccharide (m/z 369), $[4-Me-GlcA+Gal_2]$ 의 trisaccharide (m/z 531), $[4-Me-GlcA+Gal_3]$ 의 tetrasaccharide (m/z 693)가 각각 확인되었음.

○ 이로써 BCE-I-2b는 다양한 당쇄 길이의 oligo당이 혼합되어 있음을 확인할 수 있었으며, 이는 효소처리로 인한 endo type의 비특이적 가수분해에 의한 결과로 추정되었음. 한편, $[M+H]^-$ 형태의 $[4-Me-GlcA+Gal_2]$ 의 trisaccharide m/z 531 ion을 대상으로 daughter fragment ions 분석을 행하여 Fig. 69(B)와 같은 결과를 얻었음.

○ $[4-Me-GlcA+Gal_2]$ 의 trisaccharide m/z 531 ion을 대상으로 daughter fragment ions 분석을 행한 결과를 종합해 보면, 531, 369, 207 ion들이 발견되었으며, 이는 trisaccharide의 환원 말단으로부터 -162(Gal), -162(Gal) 순으로 구성당이 유리되어

나감을 말해주는 결과였음. 이 결과를 통해 BCE-I-2b는 arabino- β -3,6-galactan 비환원 말단에 4-Me-GlcA 한 분자가 적어도 2 분자의 galactose와 결합하여 존재하고 있을 것이라 추정하였음.

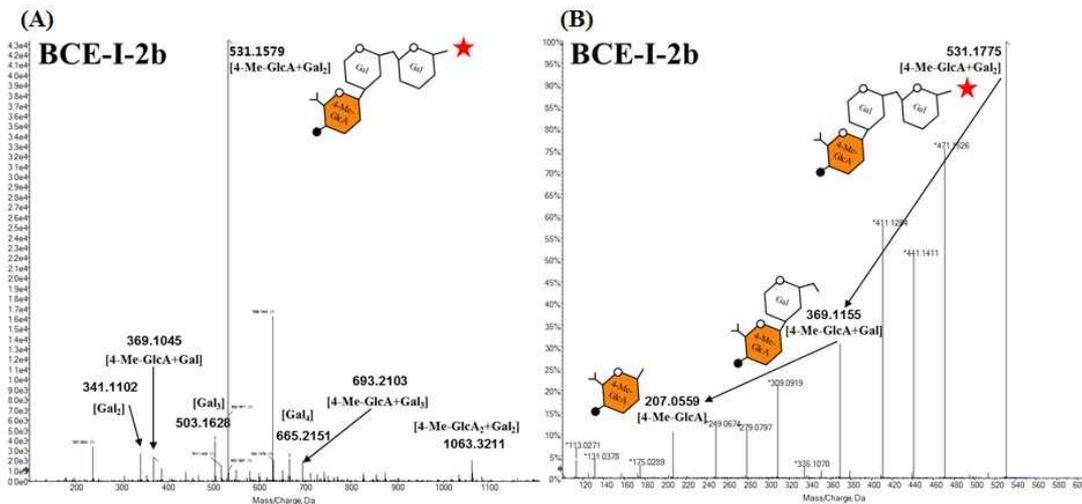


Fig 270. Negative-ion Q-TOF mass spectrum of BCE-I-2b (A), and Q-TOF MS/MS spectrum of 4-Me-GlcA+Gal₂ unit (*m/z* 531) (B) derived from BCE-I-2b

㉔ BCE-I-2b 단편의 서열분석을 위한 LC-MS 분석

- BCE-I-2b 단편에 대한 상세 구조분석을 위해 positive-ion LC-MS를 이용한 분석을 행하였음(Fig. 70(A)). [M+Na]⁺ 형태의 galactose만으로 이루어진 [Gal₃]의 trisaccharide (*m/z* 527), [Gal₄]의 tetrasaccharide (*m/z* 689)가 관찰되었으며, 4-Me-GlcA+Gal로 이루어진 [4-Me-GlcA+Gal₂]의 trisaccharide (*m/z* 555)가 각각 확인되었음. 이는 Q-TOF 분석과 유사한 결과를 나타내었음.
- Q-TOF 결과를 바탕으로 BCE-I-2b는 다양한 당쇄 길이의 oligo당이 혼합되어 있음이 재차 확인되었으며, Q-TOF에서 분석하지 못한 [M+Na]⁺ 형태의 [Gal₃]의 trisaccharide *m/z* 527 ion과 [Gal₄]의 tetrasaccharide *m/z* 689 ion을 대상으로 daughter fragment ions 분석을 행하여 Fig. 70(B)과 같은 결과를 얻었음.
- [Gal₃]의 trisaccharide *m/z* 527 ion을 대상으로 daughter fragment ions 분석을 행한 결과(Fig. 70(B-1))를 종합해 보면, 527, 365, 203 ion들이 발견되었으며, 이는 trisaccharide의 환원 또는 비환원 말단으로부터 -162(Gal), -162(Gal) 순으로 구성당이 유리되어 나감을 말해주는 결과였음. 반면, [Gal₄]의 tetrasaccharide *m/z* 689 ion

을 대상으로 daughter fragment ions 분석을 행한 결과(Fig. 70(B-2))를 종합해 보면, 689, 527, 365, 203 ion들이 발견되었으며, 이는 tetrasaccharide의 환원 또는 비환원 말단으로부터 -162(Gal), -162(Gal), -162(Gal) 순으로 구성당이 유리되어 나감을 말해주는 결과였음.

- 결론적으로, BCE-I-2b 단편획분을 통해 본 연구진은 아마도 arabino- β -3,6-galactan 구조의 측쇄부분에 적어도 3 분자 또는 4 분자의 galactose가 β -1,6 결합으로 존재하고 있을 것이라 추정하였음.

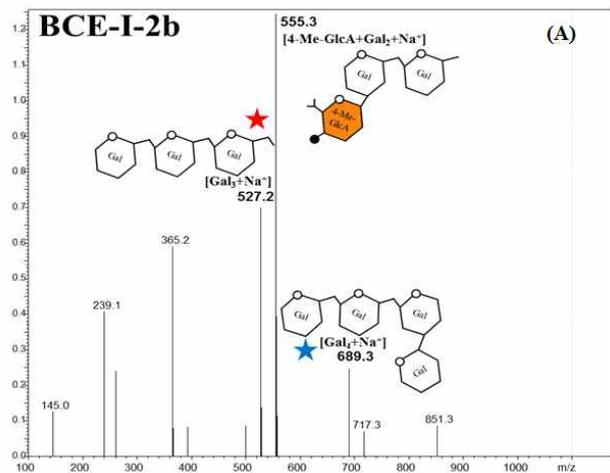


Fig 271. Positive-ion LC mass spectrum of BCE-I-2b using LC-MS

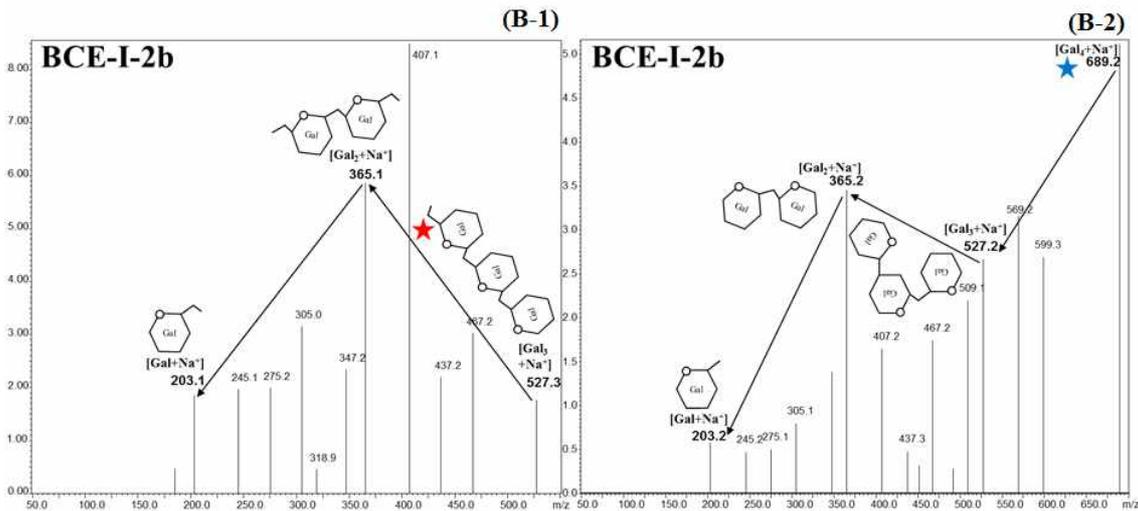


Fig 272. Positive-ion LC-MSMS spectrum of Gal-trisaccharide unit (m/z 527) (B-1) and Gal-tetrasaccharide unit (m/z 689) (B-2) derived from BCE-I-2b.

㉔ BCE-I-2c 단편의 서열분석을 위한 LC-MS 분석

- BCE-I-2c 단편에 대한 상세 구조분석을 위해 positive-ion LC-MS를 이용한 분석을 행하였음(Fig. 72). $[M+Na]^+$ 형태의 galactose만으로 이루어진 $[Gal_2]$ 의 disaccharide (m/z 365)가 확인되었음. BCE-I-2c의 경우에는 BCE-I-2b에 비해 비교적 더 짧은 당쇄길이를 가진 oligo당만이 검출되었음.
- LC-MS 결과를 바탕으로 BCE-I-2c의 $[M+Na]^+$ 형태인 $[Gal_2]$ 의 disaccharide m/z 365 ion을 대상으로 daughter fragment ions 분석을 행하여 Fig. 72(A)와 같은 결과를 얻었음.
- $[Gal_2]$ 의 disaccharide m/z 365 ion을 대상으로 daughter fragment ions 분석을 행한 결과를 종합해 보면, 365, 203 ion들이 발견되었으며, 이는 disaccharide의 환원 또는 비환원 말단으로부터 $-162(Gal)$ 의 구성당이 유리되어 나감을 말해주는 결과였음 (Fig. 72(B)).
- 결론적으로, BCE-I-2c 단편획분을 통해 본 연구진은 아마도 arabino- β -3,6-galactan 구조의 측쇄부분에 galactose가 β -1,6 결합으로 존재하고 있을 것이라 추정하였으며, 이는 endo-type이라는 효소 특성상 무작위적으로 가수분해됨으로써 다양한 분자들이 혼재되어 나타난 것이라 사료되었음.

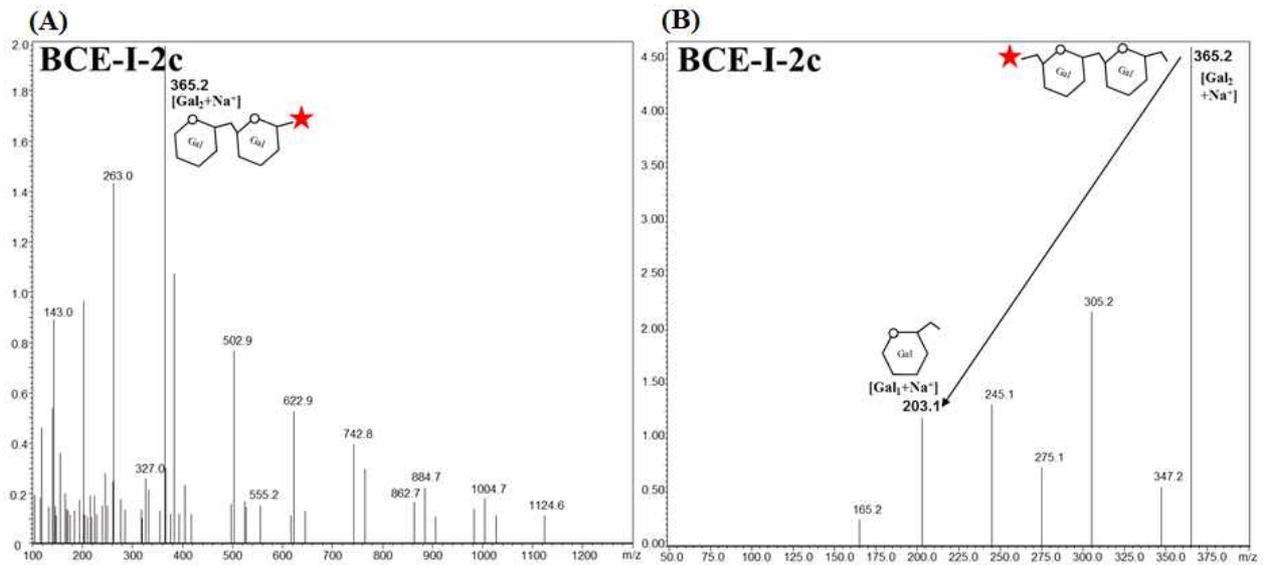


Fig 273. Positive-ion LC mass spectrum of BCE-I-2c (A), and LC MS/MS spectrum of Gal-disaccharide unit (m/z 365) (B) derived from BCE-I-2c

- BCE-I-1b와 BCE-I-2b, 2c 단편획분의 서열분석을 진행한 결과, BCE-I은

rhamnogalacturonan core에 side chain으로 arabino- β -3,6-galactan의 구조를 가지고 있으며, 특히 비환원 말단에는 arabinose, galactose, 4-Me-GlcA가 존재하는 전형적인 RG-I 구조임을 최종 확인하였음.

(4) 연속적인 효소 가수분해로 얻어진 단편획분의 macrophage cytokine 생산 자극 활성 비교

- Macrophage는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 cytokine을 분비하여 면역현상을 조절하며, 항원에 대한 면역작용의 중추적인 역할을 하는 세포로서, 항원제시와 림프구의 비 특이적 면역작용에 관계하며, 종양세포에 대해서는 직접적인 상해활성을 나타냄.
- 또한 TLR (toll like receptor)에 반응하는 물질(LPS 혹은 천연물)은 macrophage를 활성화하여 T세포와 B 세포의 증식, 식균 작용을 위한 대식세포의 활성화, 미생물 감염에 대한 방어 등의 2차 면역반응을 조절할 수 있는 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF- α 와 같은 cytokine을 생산한다고 알려져 있음.
- IL-6 및 TNF- α 는 macrophage에 의해 유도되는 대표적인 cytokine으로써 세균감염에 따른 염증반응에 있어서 중추적인 역할을 하며, 특히 IL-6는 IL-1과 협동적으로 작용하여 T 세포와 B 세포의 분화에 관여하고 항암효과가 있다고 보고되고 있음. 또한, IL-12는 NK cell의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응을 유도하는 cytokine으로써 암세포와 같은 세포성 외래물질에 대한 반응성을 높이는 작용을 한다고 알려져 있음.
- 브로콜리 유래 면역 활성 다당 BCE-I은 macrophage를 자극하여 각종 cytokine 생산을 유도함으로써 면역기능을 높이는 사실이 이전 실험에서 확인되었던 바, 이들 활성에 공헌하는 구조 특성을 규명하기 위해 BCE-I을 대상으로 효소처리를 행하여 각 과정으로부터 얻어진 oligo당들을 분리, 정제하였음.
- 이들의 분해산물을 이용하여 어느 부분의 단편 획분이 BCE-I의 면역활성에 공헌하는지 알아보고자 IL-6 (Fig. 73), IL-12 (Fig. 74) 및 TNF- α (Fig. 75) 생산 활성을 평가하였음. 브로콜리 유래 면역활성 다당 BCE-I은 rhamnose와 galacturonic acid가 번갈아 연결된 rhamnogalacturonan 주쇄에 arabino- β -3,6-galactan 구조만으로 존재함이 앞선 연구에서 밝혀졌으므로 BCE-I-1b의 경우 비환원말단 arabinose, galactose 및 4-Me-GlcA가 제거된 저분자 다당으로 추정할 수 있었음. 따라서 BCE-I-1a 구조가 비환원말단에 존재하는 단당을 제거함으로써 훨씬 더 높은 활성을 나타낸다는 사실은 RG-I의 arabino- β -3,6-galactan 측쇄 부분의 비환원 말단에 존재하는 단당은 활성에 공헌하지 않음을 시사하였음.

- 한편 BCE-I-1a를 galactan-1,3- β -galactosidase 처리하여 β -(1 \rightarrow 3)-galactan 주쇄가 제거된 고분자 획분 BCE-I-2a의 경우도 여전히 높은 활성이 관찰되었을 뿐만 아니라 BCE-I-2b와 2c에서도 높은 활성이 나타난 것으로 보아 아마도 β -(1 \rightarrow 6)-galactan 측쇄부분이 활성에 공헌하는 것으로 추정되었음.
- 따라서 브로콜리 유래 BCE-I은 rhamnagalacturonan I의 특징적 구조를 소유하며, 측쇄로 존재하는 type II arabinogalactan 즉, arabino- β -3,6-galactan 구조가 주된 활성부위(main active moiety)임이 최종 추정되었음.

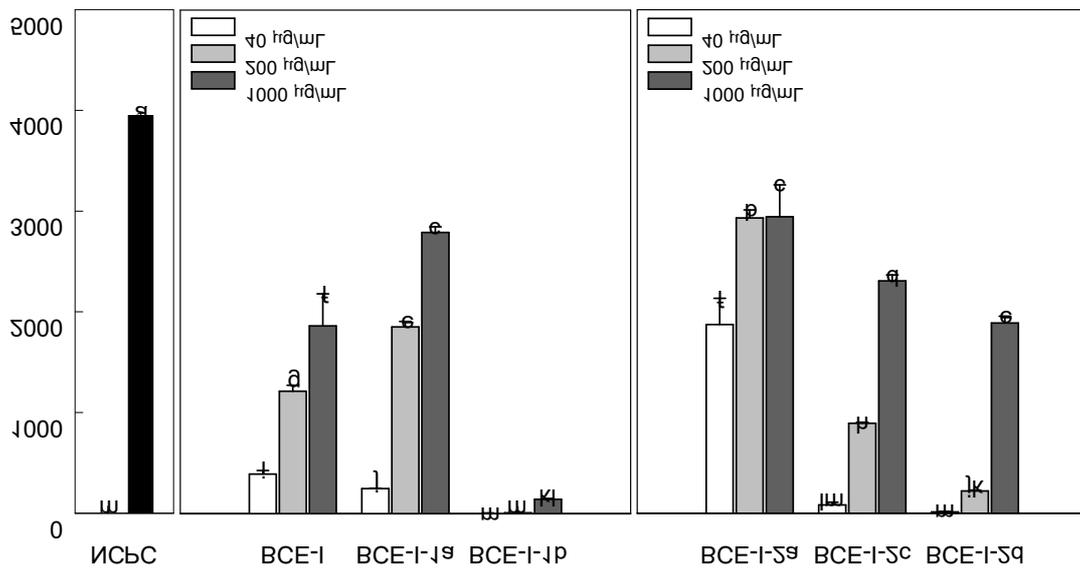


Fig 274. Effect of BCE-I and its subfractions obtained by enzymatic hydrolysis on IL-6 production

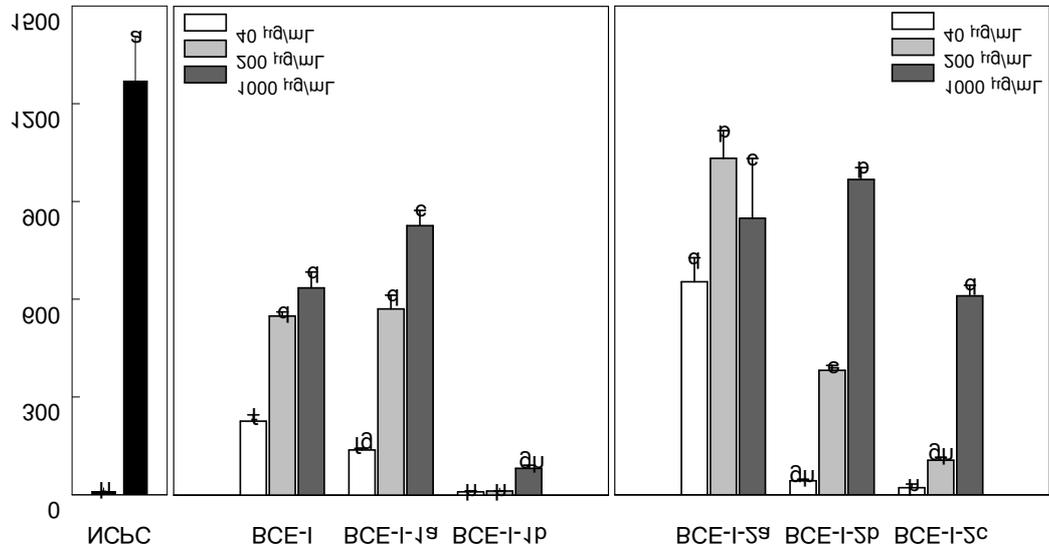


Fig 275. Effect of BCE-I and its subfractions obtained by enzymatic hydrolysis on IL-12 production

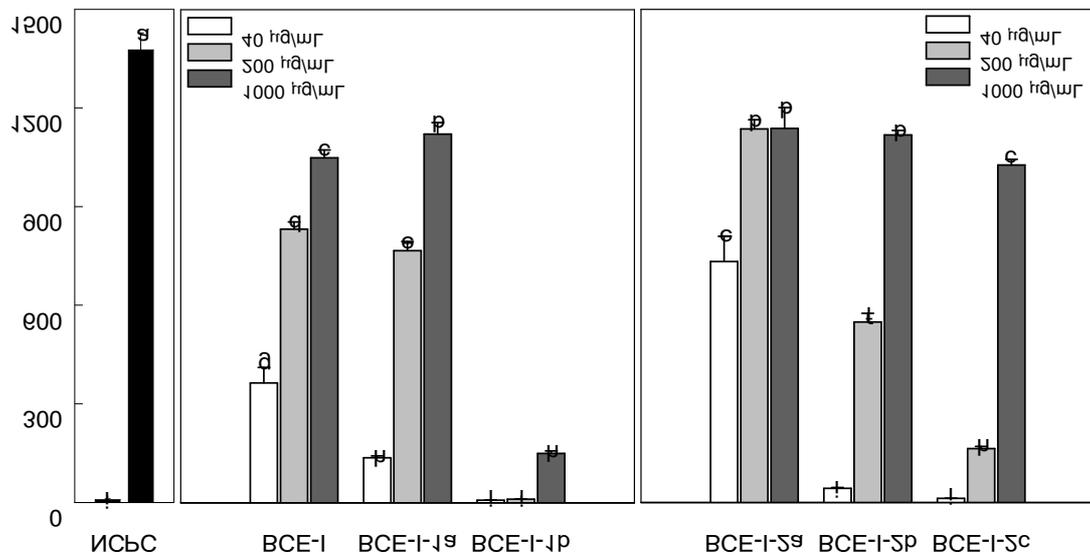


Fig 276. Effect of BCE-I and its subfractions obtained by enzymatic hydrolysis on TNF-α production

(5) 브로콜리 유래 면역활성 다당 BCE-I의 최종 구조

○ 앞선 구성당, Yariv reagent, methylation analysis, Q-TOF 및 LC-MS를 이용한 서열분석 결과를 모두 종합해보면, galactose와 arabinose 그리고 galacturonic acid의 함량이 높고 1→3, 1→6 결합이 고도로 분지된 arabino-β-3,6-galactan이라는 것을 확인하였음. 이러한 결과와 기존에 보고된 RG-I의 구조를 바탕으로 예상되는 전체구조는 Fig. 76과 같

음.

- 면역 활성화와 항전이 활성이 우수한 BCE-I은 약 50 kDa의 다당체로서, 전체 약 300 여개의 단당으로 구성되어 있으며, 이들 전체 구조에 대하여 도식화하기 어려운 바, 약 1/8 로 축소하여 구조를 추정하였음.
- 우선 구성당 및 sequencing 분석결과에서 rhamnose와 galacturonic acid가 존재하는 것으로 보아 $[-4)-\alpha-D-GalA-(1,2)-\alpha-L-Rha-(1)]_n$ 이 반복적으로 연결된 주쇄에 3,6-linked, 6-linked galactose가 많이 존재하는 것으로 보아 $\beta-1,3-galactan$ 을 중심으로 $\beta-1,6-galactan$ 이 고도로 분지되어 있고 arabinose와 galactose가 구성되어 있음을 확인할 수 있었으며 말단에 arabinose 또는 4-Me-GlcA가 결합된 type II arabino- $\beta-3,6-galactan$ 인 것으로 추정되었음.
- 또한 구성당에서 galacturonic acid가 rhamnose에 비해 약 2배 정도 높은 비율로 존재하는 것을 확인할 수 있었는데, 이를 methylation analysis 결합 양식으로 분석하려고 하였으나, 수십 μg 의 낮은 농도로 검출한계가 있었을 뿐만 아니라, acetyl화된 산성당을 검출하지 못하여 결합양식을 확인하는데 어려움이 있었음.
- 따라서 앞선 구성당 결과를 바탕으로 유추하게 된다면 RG-I 구조에 결합된 arabino- $\beta-3,6-galactan$ 의 구조가 크고 복잡하게 연결되어 있어 구조적 장애로 인하여 pectinase 효소가 RG-I에 인접하여 결합되어있는 HG 부분을 완전히 가수분해하지 못하고 남은 구조에 기인한 것으로 추정되었음.
- 이상의 결과로부터 십자화과에 속하는 브로콜리 식물체에서 높은 면역 및 항전이 활성을 보인 BCE-I은 1,3-galactan을 중심으로 1,6-galactan이 고도로 분지된 type II arabino- $\beta-3,6-galactan$ 의 구조를 소유하고 있으며, 이들 구조가 면역세포인 macrophage와 NK cell 및 CTL 등을 활성화 하며 최종적으로 항암, 항전이 활성에도 공헌함을 최종 확인하였음.

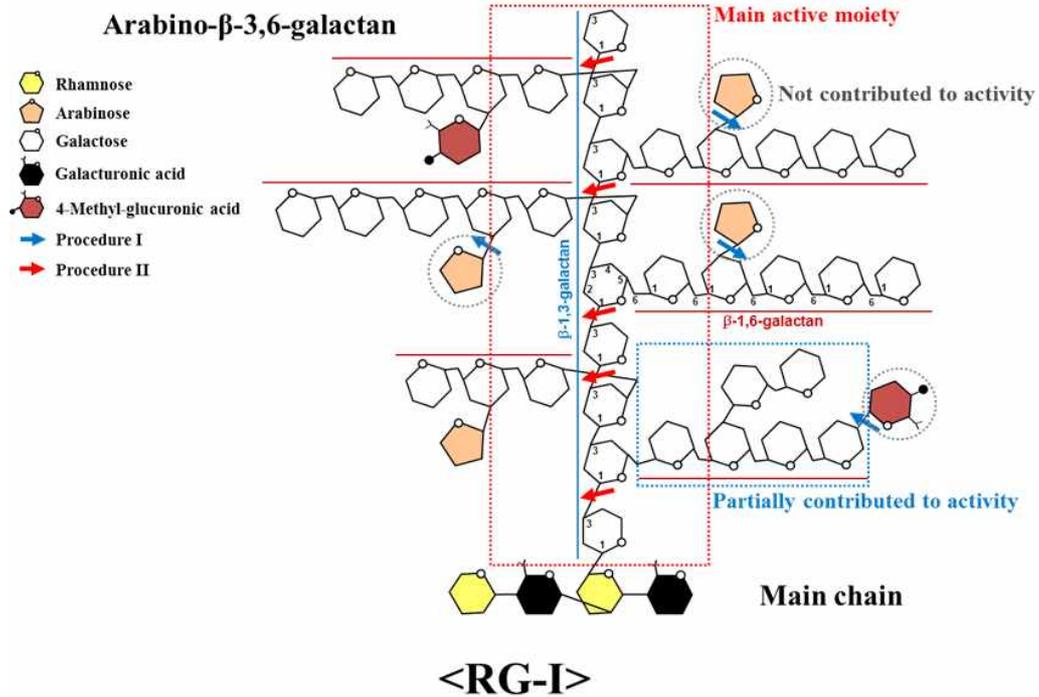


Fig 277. A proposed structure of an immunomodulatory polysaccharide (BCE-I) purified from broccoli.

아. 적양배추로부터 분리한 다당의 면역활성 및 항암활성 평가

- 본 연구진은 1차년도에 십자화과 식물 4 종(브로콜리, 방울양배추, 적양배추, 무)에서 *in vitro* 상에서 스크리닝을 한 결과 수율 및 활성을 고려하여 최종 브로콜리를 선택하여 면역활성 및 항전이효과를 확인하고, 이의 활성분체인 BCE-I은 arabino- β -3,6-galactan side chain을 가진 RG-I 구조라는 것을 규명하였음.
- 그러나 1차년도 스크리닝 과정에서 활성이 가장 우수했던 것은 적양배추였으나, 수율이 다른 식물에 비해 낮아 추후 상업적으로 이용 가능성까지 고려한다면 최종적으로 선택하기에는 적절치 못했음. 따라서 추과 성과로 *in vitro* 및 *in vivo* 상에서 동물실험을 진행하여 면역활성 및 항암활성에 대한 정보를 제공하고자 함.

(1) 적양배추 유래 시료의 분리

- PEF 처리 후 남은 적양배추 잔사 100g을 거칠게 마쇄하고, 2배 부피인 200 mL의 물을 가하여 1시간 동안 정치하였음. 이후, 최종 부피의 8배 ethanol (EtOH)을 첨가하여 2시간 동안 균질화 시킨 후, 원심분리기 (6,500 rpm, 20분, 4°C)를 이용하여 침전물을 회수하였음. 이를 10배 부피인 물에 용해시킨 후, 총 부피의 반이 될 때까지 열수추출을 진행하였음. 그 후, 원심분리기 (6,500 rpm, 30min, 4°C)를 이용하여 상등액을 회수하고,

상등액의 반량을 회전감압 농축장치를 이용하여 농축하였으며 이후 동결건조 (FreeZone 12 Liter, Labconco, Kansas city, MI, USA)하여 적양배추 유래 단순 열수 추출물 RCW를 얻었음 (Fig. 1).

- 나머지 반량의 상등액은 총 부피의 4배 ethanol (EtOH)을 첨가하여 24시간동안 정치하였음. 침전물은 투석막 (MW cut-off 14,400) (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 2일간 투석을 행하여 저분자 물질을 제거하였음. 이를 회전감압 농축장치를 이용하여 농축하였으며 이후 동결건조 (FreeZone 12 Liter, Labconco, Kansas city, MI, USA)하여 적양배추 유래 열수추출 조다당 RCP를 얻었음 (Fig. 1).

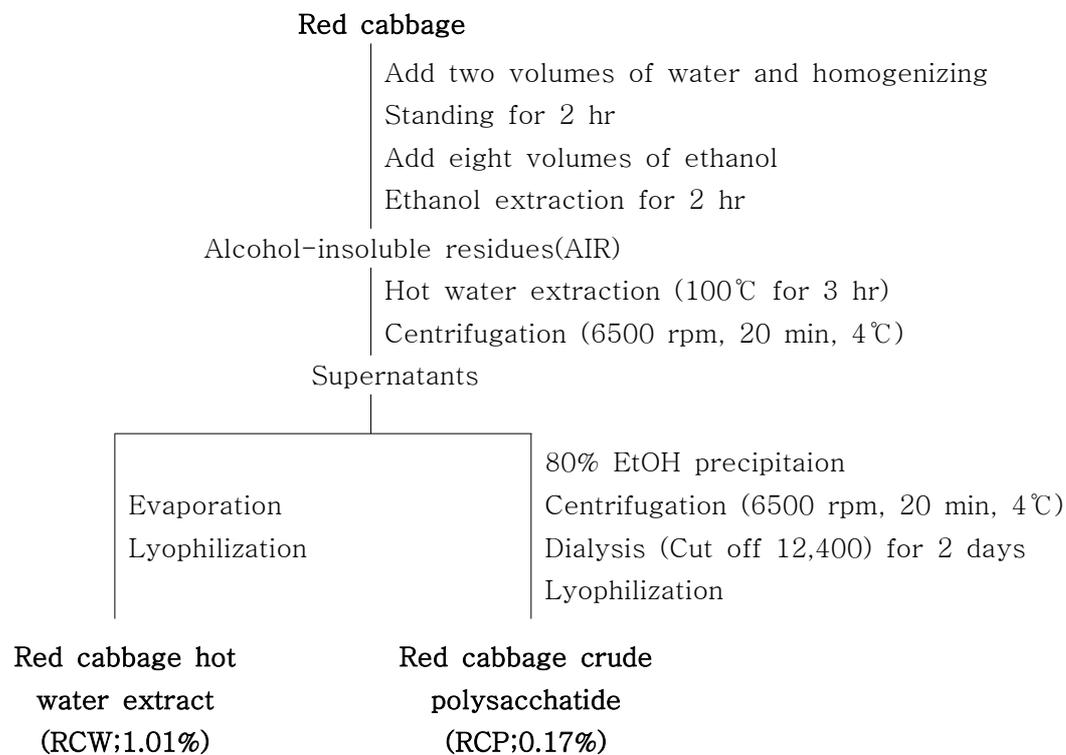


Fig 278. Isolation of water extract and crude polysaccharides from red cabbage.

(2) 적양배추 유래 시료의 일반화학적 특성

- 적양배추 유래 단순 열수추출물 RCW와 열수추출 조다당 RCP의 화학적 특성을 살펴본 결과, RCW의 경우 중성당 60.0% 및 산성당 36.7%로 구성되어 있었으며 단백질 및 KDO는 소량 검출되었음. 반면 RCP는 중성당 40.0%, 산성당 58.9% 및 소량의 단백질과 KDO가 검출되었음(Table 95).

- 한편, 구성당 분석 결과에서는 RCW는 glucose와 arabinose가 각각 28.2%, 14.6%의 높은 비율로 함유하고 있었으며, RCP는 arabinose와 galactose가 27.5%, 17.2%의 비율로 함유하고 있었음. 또한 RCW와 RCP는 uronic acid가 각각 36.7%, 58.9%의 비율로 높게 함유하고 있었음(Table 2).
- 일반적으로 펙틴 유래 다당은 주로 homogalacturonan, rhamnogalacturonan(RG)-I 및 RG-II로 구성되어 있다고 보고되고 있는데, 특히 RG-I의 경우 RG 주쇄에 arabinan, galactan 및 arabinogalactan가 고도로 분지된 구조를 가지고 있다고 알려져 있음. 따라서 RCP의 구성당 분석 결과로 미루어 볼 때, 이들은 galactan, arabinan 혹은 arabinogalactan이 분지된 전형적인 RG 형태로 존재할 가능성을 시사하였음.

Table 95. Chemical properties of RCW and RCP isolated from red cabbage.

| Chemical composition (%) | RCW | RCP |
|--------------------------|----------|----------|
| Neutral sugar | 60.0±5.0 | 40.0±1.6 |
| Uronic acid | 36.7±0.8 | 58.9±1.7 |
| Protein | 1.4±0.1 | 0.4±0.5 |
| KDO-liked materials | 2.3±0.5 | 1.0±0.5 |
| Polyphenol | 0.0±0.3 | 0.0±0.4 |
| Component sugar | | (Mole%) |
| Rhamnose | 5.0±0.3 | 7.7±0.3 |
| Fucose | 0.5±0.1 | 0.9±0.0 |
| Arabinose | 14.6±0.2 | 27.5±1.0 |
| Xylose | 1.7±0.0 | 2.4±0.0 |
| Mannose | 1.9±0.1 | 2.1±0.1 |
| Galactose | 8.1±0.2 | 17.2±1.2 |
| Glucose | 28.2±0.7 | 2.3±0.1 |
| KDO+ DHA | 2.3±0.5 | 1.0±0.5 |
| GalA+ GlcA | 36.7±0.8 | 58.9±1.7 |

(3) 적양배추 유래 시료의 분자량 분포 측정

- 적양배추 유래 단순 열수추출물 RCW와 조다당 RCP의 순도 확인 및 분자량 측정을 위해 Ashai-Pak GS-520+GS-320+GS-220을 이용하여 HPLC (high performance liquid chromatography)를 행하였음.
- 표준물질 (pullulan series)을 이용하여 RCW와 RCP의 주 peak 분자량을 확인한 결과

(Fig. 2), RCW의 경우 730 kDa, 93 kDa 및 31 kDa 분자량을 가진 peak pattern이 나타나 다양한 물질을 함유하고 있다는 것을 확인하였으며, RCP의 경우 34 kDa의 분자량이 주요 peak pattern을 이루고 있는 다당인 것으로 확인되었음.

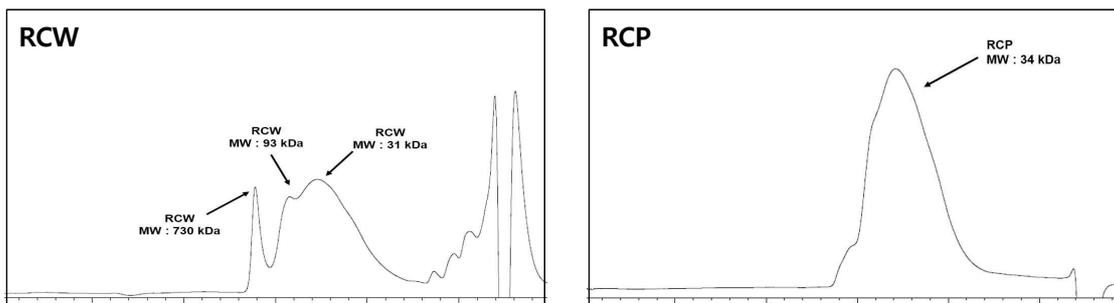


Fig 279. Elution patterns of RCW and RCP isolated from red cabbage on size exclusion HPLC. HPLC equipped with Asahi-Pak GS-520+GS-320+GS-220 linked columns.

(4) β -Glucosyl Yariv reagent를 이용한 arabino- β -3,6-galactan (type-II)의 존재 확인 및 정량

- 적양배추 유래 열수추출 조다당 RCP은 앞선 구성당 결과에서 galactose 및 arabinose 가 높은 비율로 구성하고 있어 arabinogalactan으로 존재할 것으로 예상되어 이를 확인하기 위하여 β -glucosyl Yariv reagent와의 반응성을 확인하였음. β -Glucosyl Yariv reagent [1,3,5-tri-(4- β -glucopyranosyl oxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxybenzene]는 다당과 반응하는 유일한 발색 시약이며 arabino-galactan 중에서도 II형의 arabino- β -3,6-galactan과 특이적으로 반응하여 적색 침전을 형성하는 것으로 알려져 있음. 이 시약을 이용하여 적양배추 유래 단순 열수추출물 RCW와 열수추출 조다당 RCP에 대한 single radical gel diffusion을 진행하였음.
- 그 결과, arabino- β -3,6-galactan의 표준물질인 gum arabic의 경우, 62.5 μ g/mL 농도부터 1,000 μ g/mL 농도까지 농도 의존적으로 침전환이 커짐을 확인할 수 있었음(Fig. 3). 또한, 적양배추 유래 단순 열수추출물 RCW와 열수추출 조다당 RCP에서도 침전환이 관찰되었음(Fig. 3).
- 이를 표준물질의 침전환과 비교한 결과, 전체 구조에 arabino- β -3,6-galactan이 RCW의 경우 2.41%, RCP의 경우 9.69% 포함되어 있음을 확인할 수 있었음(Fig. 3). 따라서 RCW 및 RCP의 구조 내에는 II형 arabinogalactan 구조가 일부 포함되어 있으며, 특히 적양배추로부터 분리한 조다당 RCP는 비교적 RCW보다 arabino- β -3,6-galactan이 더 높은 비율로 함유되어있는 것을 확인하였음.

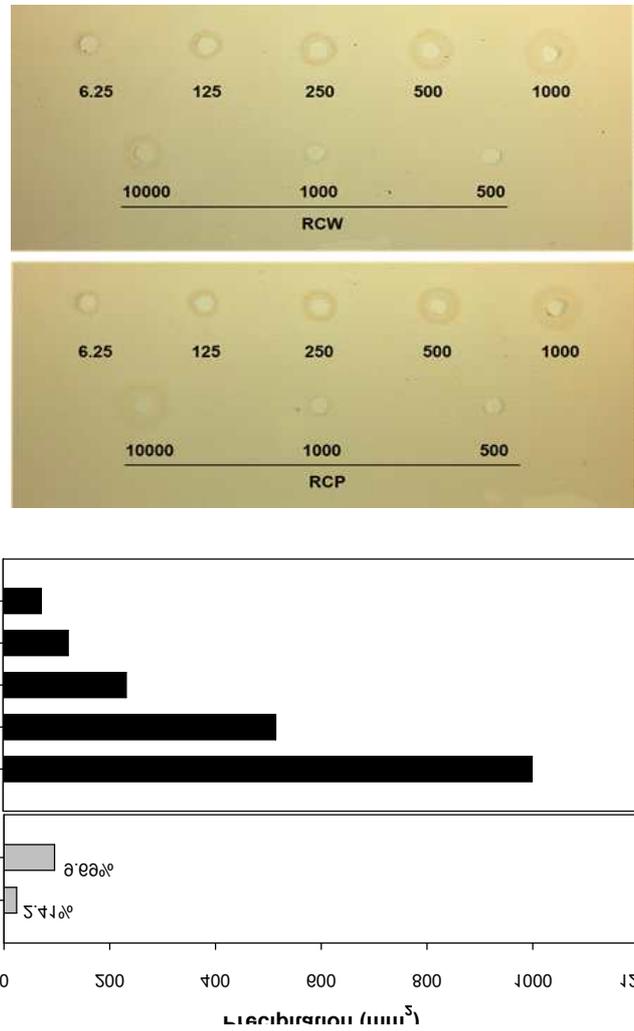


Fig 280. Single radial gel diffusion (A) and reactivity (B) between β -glucosyl Yaviv reagent and polysaccharide fractions isolated from red cabbage.

(5) 정상세포 및 암세포에 대한 세포 독성

○ 종양세포 및 일반세포에 대한 시료의 세포독성 여부를 확인하고자 종양세포주인 B16BL6 melanoma 및 mouse macrophage cell를 각각 2×10^6 cells/mL의 농도로 계수한 후 flat-bottomed 96-well microplate에 100 μ L씩 분주하고 여러 농도로 조정된 적양배추 시료를 각 well에 100 μ L씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1일간 배양하였음. 각 시료농도에 따른 세포 독성의 효과는 EZ-cytox (Dogen, Seoul, Korea)를 5배 희석하여 well 당 100 μ L씩 가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 15~60분간 반응시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였음.

○ 2×10^6 cells/mL로 조정된 종양 및 일반세포주에 적양배추 유래 단순 열수추출물

RCW와 열수추출 조다당 RCP를 1, 10, 100 및 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지의 다양한 농도로 가하여 배양한 후 세포의 생존여부를 확인하였음.

- B16BL6 세포의 경우 두 시료 모두 암세포를 직접적으로 사멸시키는 것을 확인하였음 (Fig. 4(A)). 또한, 각 실험 농도에서 mouse 복강 유래 macrophage 세포에서는 뚜렷한 독성을 나타내지 않았으며, RCP의 경우 시료농도 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상에서 오히려 세포 증식 효과가 관찰되었음(Fig. 4(B)).
- 이상의 결과로부터 적양배추 유래 단순 열수추출물 RCW와 열수추출 조다당 RCP는 암세포에 대해 직접적인 사멸을 나타냈으며, 일반세포에 대해 증식능을 보인다고 확인하였음.

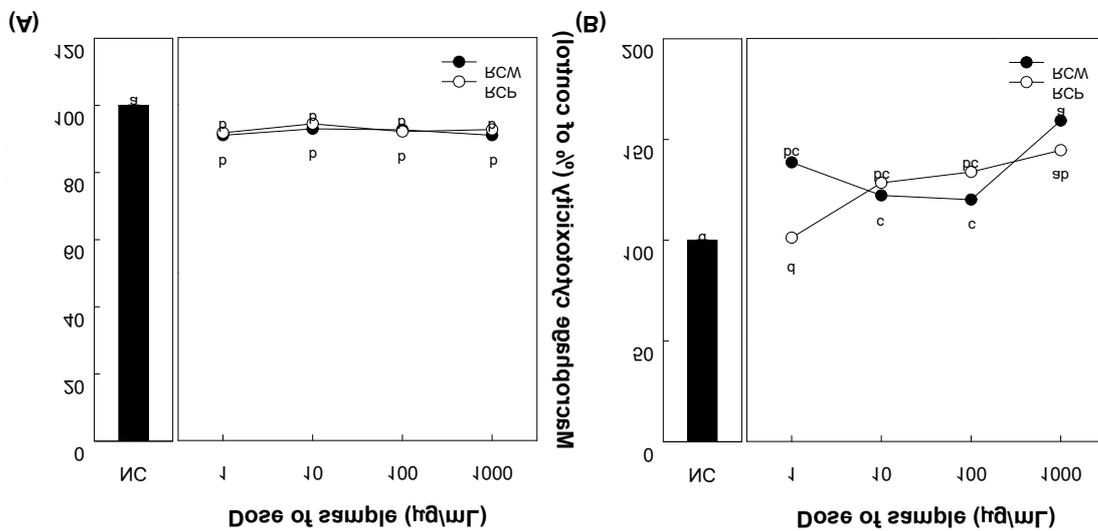


Fig 281. Cytotoxic effect of RCW and RCP isolated from the red cabbage on B16BL6 melanoma cell lines (A) and macrophage cells (B) *in vitro*. NC used media as a negative control. Means with different superscript letters (a-d) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(6) 대식세포 활성화

- 적양배추 시료의 직접적인 자극에 의한 macrophage의 cytokine 생산을 *in vitro*에서 측정한 결과 (Fig. 5), 적양배추 유래 열수추출물 RCW는 cytokine 생산능을 거의 나타내지 않는 반면, 열수추출 조다당 RCP는 IL-6, IL-12 및 TNF- α 의 생산이 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 저농도에서도 높게 나타냈음. 이러한 결과들로 미루어 보아 적양배추 유래 열수추출 조다당 RCP가 단순 열수추출물 RCW보다 생체방어에 작용하는 면역세포를 활성화(조절)하는 기능이 더 우수하다고 판단되었음.

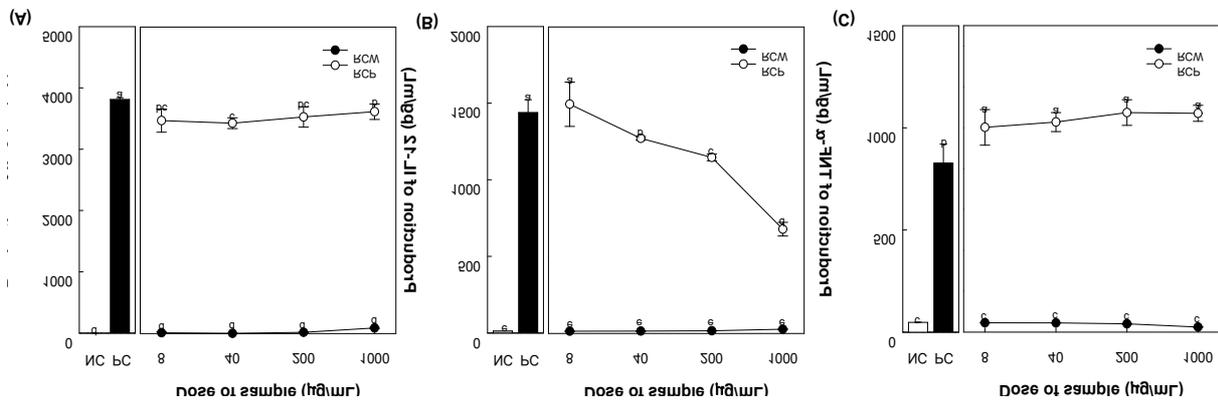


Fig 282. Effect of RCW and RCP on the secretion of cytokines (IL-6 (A), IL-12 (B), TNF- α (C)) in murine peritoneal macrophages. NC used media as a negative control and PC used lipopolysaccharide (LPS, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as a positive control. Means with different superscript letters (a-d) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(7) 적양배추 유래 조다당의 자연 살해 세포(NK cell)에 의한 종양 세포 살해능

- 앞선 연구에서 mouse로부터 유도한 macrophage를 이용하여 cytokine 생산능을 측정한 결과 높은 IL-6, IL-12, TNF- α 생산능을 보여준 적양배추 유래 열수추출 조다당 RCP를 각 10, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 로 정맥 주사하여 얻어진 비장 유래 세포(splenocytes, NK cells)는 target cell인 암세포주 (YAC-1)에 대한 effect cell (splenocytes)의 비율 (E/T ratio)이 증가할수록 유의적으로 종양세포에 대해 높은 살해능을 나타내었으며, 특히 살해능은 E/T ratio=100:1에서 가장 우수한 활성이 관찰되었음.
- 이를 통해 적양배추 유래 열수추출 조다당 RCP는 종양세포에 대한 살해능을 가지는 NK cell의 활성화에 기여함을 확인할 수 있었으며, 따라서 NK cell 활성화에 의한 항암활성을 가질 것이라 결론지었음.

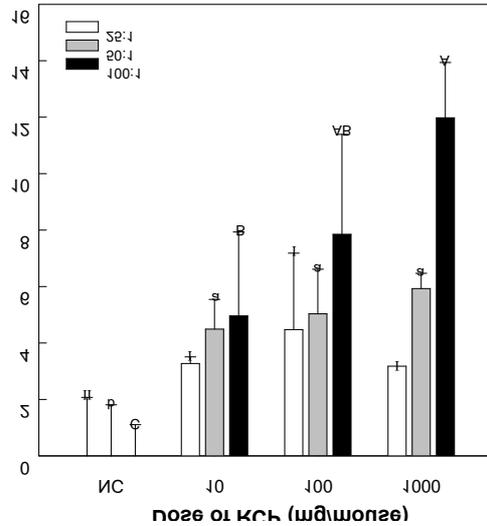


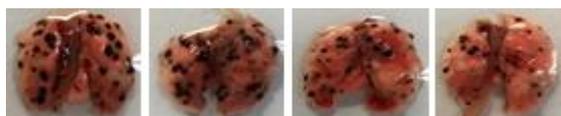
Fig 283. Effect of RCP on cytolytic activity of natural killer (NK) cells *ex vivo*. NK cells were cultured with YAC-1 target in presence or absence of RCP for 6 hr at 37°C CO₂ incubator. Means with different superscript letters (I-II, a-b, A-C) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(8) 적양배추 유래 조다당의 항전이 활성화능

- 시료의 항전이 활성화는 폐 (lung)에 대한 고전이성 종양세포주인 melanoma B16BL6을 이용한 실험동물 종양전이 모델을 이용하였음. 시료에 의한 종양전이 효과를 관찰하기 위해 적양배추 유래 열수추출 조다당 RCP 시료를 각 농도별로 종양 투여 3일전과 1일 전에 정맥주사(*i.v.*)하였음. 이후, B16BL6 lung melanoma (3×10^4 cells/mouse)를 BALB/c mouse에 정맥 주사하였음. 종양접종 14일 뒤 mouse를 치사시키고, 종양세포의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's solution (Sigma)으로 전이된 종양을 고정시킨 후, 전이된 종양의 colony를 계수하였음.
- 그 결과 (Fig. 7), 생리식염수를 정맥주사(*i.v.*)한 대조군이 100% 전이된 것으로 하여 RCP의 항전이 활성을 확인한 결과, RCP를 정맥주사(*i.v.*)한 군에서 농도의존적인 항전이 활성을 나타내었음. 특히, 1000 μg/mouse 정맥주사(*i.v.*)한 군에서 대조군 대비 약 47% 이상의 우수한 항전이 효과가 확인 되었음.
- 이는 적양배추 유래 열수추출 조다당 RCP는 종양의 전이를 억제하는데 유효함을 나타내며, 앞선 NK cell 자극 활성화실험의 유효 투여량과 동일한 농도에서도 항전이 활성을 보임을 확인하였음. 이는 RCP에 의한 종양전이 억제효과가 주로 NK cell의 활성화에 의한 활성임을 알 수 있었음.

○ 위 결과를 종합해 볼때, 적양배추 유래 RCP는 대식세포를 활성화 시키는 것으로 확인 되었으며, 활성화된 대식세포가 분비하는 cytokine에 의해 NK cell이 활성화되어 강력한 항전이 효과가 나타내는 것으로 최종 확인되었음.

(A)



Control RCP RCP RCP
 10µg 100µg 1000µg

(B)

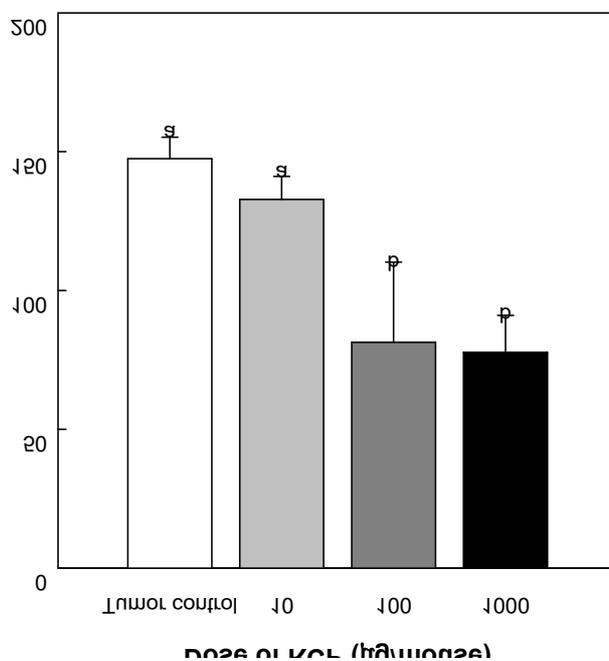


Fig 284. Inhibitory effect of RCP from red cabbage on lung metastasis produced by *i.v.* inoculation of B16BL6 melanoma cells. Five BALB/c mouse per group were inoculated *i.v.* with 3×10^4 B16BL6 melanoma cells and administered intravenously with the indicated doses of RCP suspended in PBS on 2 days before tumor inoculation. Mice were sacrificed at 16 days after tumor inoculation and excised lung to count colonies number. Means with different superscript letters (a-b) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

D-06

<주관기관 비케이바이오>

| 구분 (연도) | 세부과제명 | 세부연구목표 | 달성도 (%) | 연구개발 수행내용 |
|--------------------|---|--|------------|---|
| 1차 년도 (2014) | ○ 십자화과 품종 별 특성 파악 및 평가법 확립과 최적 공정 개발 을 통한 산업화 | ○ 면역증강 성분의 분석법을 확립하여 제품 표준화 및 규격 설정을 위한 표준을 마련 ○ 시생산을 통한 품질 검증 및 산업화를 위한 제품 개발 | 100 | ○ 십자화과 식물인 브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 순무, 무의 성 체 및 싹 종류별 품종 연구 : 성체 및 싹의 설폴라판 및 전구체의 함량 비교 연구. 원료 수급 용이성 및 기 능 성분 함량의 상관 관계 연구 |
| | | | 100 | ○ 면역증강 성분 Sulforaphane와 전 구체 glucosinolate의 HPLC, LC-MS 법을 통한 분석법 표준화 : 정밀 분 석을 위한 LC-MS 분석법 확립과 생 산 시 분석 효율화를 위한 간편 HPLC분석법 확립 |
| | | | 100 | ○ 표준화 분석법을 통한 원료별 물 리, 화학적 품질 및 특성 평가 : 원료 및 완성품 물리적, 화학적, 미생물학 적 품질 평가를 통한 품질지표 확립 (물성, 경도, 수분, pH, 일반 미생물, 위해 미생물, 색, 외관 등) |
| 2차 년도 (2015) | ○ 십자화과 품종 별 특성 파악 및 평가법 확립과 최적 공정 개발 을 통한 산업화 | ○ 원료 및 성과물에 대한 물리, 화학적 평가를 통해 최적의 원 료를 선정하고, 생산 공정을 최적화 | 100 | ○ 산업화를 위한 최적 sulforaphane 증폭과 면역증강 활성을 가지는 십자 화과 식물 원료의 선정 : 성체 및 싹 의 설폴라판 증폭 및 면역 증강 기능 의 교차 확인. 최대 함량 및 기능을 보유한 원료의 선정 |
| | | | 100 | ○ Sulforaphane의 최대 증폭을 위한 최적의 PEF처리 조건 선정 |
| | | | 100 | ○ PEF처리 공정 연속 공정 디자인과 공정별 변수 최적화(처리시간, 수분 조절 등) 및 scale up : 생산물 획득 을 위한 공정별 제어 기술 확립, 기 능성분 함량 설정 및 공정 단계별 목 적 성분 평가, scale up을 통한 공정 재현성 확인과 control point & factor 설립 |
| 100 | ○ PEF처리 농산품의 물리, 화학적 품질 특성 평가 비교와 안정성 평가, 가공적성 연구, 품질관리 등 품질 기 준 규격 가이드 설정 | | | |
| 3차 년도 (2016) | ○ 십자화과 품종 별 특성 파악 및 평가법 확립과 | ○ 시생산을 통한 품질 검증 및 산업화를 위한 제품을 완성 | 100 | ○ PEF처리 농산품을 원료로 한 분말 화 연구 및 엑기스 제조를 위한 추출 법 개발 |

| | | |
|------------------|-----|---|
| 최적 공정 개발을 통한 산업화 | 100 | ○ 분말화 방법에 따른 기능 물질의 보존 연구 |
| | 100 | ○ 착즙, 추출, 농축 등의 가공 단계별 기능 물질의 보존 연구 |
| | 100 | ○ 분말 및 엑기스 제품의 품질 규격 가이드 설정 |
| | 100 | ○ 물리적, 화학적, 미생물학적 규격 설정 연구 |
| | 100 | ○ 농산가공 소재의 산업화를 위한 포장 및 저장법 개발 : 농산가공 소재류의 유통을 위한 소재 유형별 최적 포장형태 선정 및 포장방안 구축 |
| | 100 | ○ pilot test를 통한 공정 검증 및 최종 prototype의 완성과 관능, 품질, 가공적성, shelf-life 평가 |
| | 100 | ○ 개발된 농산품 2종 및 소재 4종의 시제품 생산 |

<위탁기관 어량진영농조합법인>

| 구분 (연도) | 세부과제명 | 세부연구목표 | 달성도 (%) | 연구개발 수행내용 |
|----------------|--|--|------------|---|
| 1차년도 (2014) | ○ 십자화과 식물들의 성체 및 싹의 종류별 품종 연구와 원료 수급 체계 확립 | ○ 제주산 십자화과 식물들의 품종 및 재배 정보를 수집하여 제시한다. | 100 | ○ 십자화과 식물인 브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 순무, 무의 성체 및 싹 종류별 품종 및 지역 내 재배 환경 조사 |
| | | ○ 설포라관 생성이 우수하며, 가공품 개발 및 원활한 수급이 가능한 품종을 선택하여 후보 품종을 제시한다 | 100 | ○ 주관기관에서 분석한 기능 성분의 함량, 재배 및 수급 용이성 비교를 통한 후보 품종 선정 |
| 2차년도 (2015) | ○ 십자화과 식물들의 성체 및 싹의 종류별 품종 연구와 원료 수급 체계 확립 | ○ 선정된 품종의 효율적이고 경제적인 수급 체계를 제시한다 | 100 | ○ 선정된 품종의 재배, 수급, 공급의 제공법 확립 |
| 3차년도 (2016) | ○ 십자화과 식물들의 성체 및 싹의 종류별 품종 연구와 원료 수급 체계 확립 | ○ 시생산을 위한 선정 원료 제공 및 산업화를 위한 재배를 추진 | 100 | ○ 시제품 생산을 위한 원료 공급 및 산업화를 위한 재배 착수 |

<제 2 세부기관 중앙대학교>

| 구분 | 세부과제명 | 세부연구목표 | 달성도 | 연구개발 수행내용 |
|----|-------|--------|-----|-----------|
|----|-------|--------|-----|-----------|

| (연도) | | | (%) | |
|--------------------|---|--|-----|--|
| 1차 년도 (2014) | ○ 설 포 라 판 (Sulforaphane) 증폭을 위한 펄스에너지(PEF) 처리 조건 확립, 품종 및 제품별 비교 평가 | ○ Small scale batch chamber에서의 PEF 공정변수확립 | 100 | ○ 0.5~2.5 kV/cm 영역에서 십자화과 식물의 펄스처리 적용 ○ 십자화과 식물의 펄스처리 조건 확립을 위한 세포막 붕괴도 측정 시스템 구축 |
| | | ○ Batch PEF chamber를 이용한 세포막 붕괴 kinetics 및 변수 연구 | 100 | ○ Ion leaching, Zp Index 를 이용한 세포막 붕괴도의 정량적 측정 ○ 무, 브로콜리를 대상으로 펄스처리 정도에 따른 세포막 붕괴도 특정 |
| | | ○ 십자화과 식물의 기능성 성분 전환 효소인 myrosinase의 활성 측정법 표준화 | 100 | ○ Sinigrin hydrate를 전구체로 하고 Go assay kit를 활용한 myrosinase 활성 측정법 사용 |
| | | ○ Buffer 및 원료 내의 enzyme activation or inactivation kinetics 상관성 연구 | 100 | ○ 1.5 kV/cm 이상의 펄스강도에서 세포막의 변성확인 ○ Myrosinase의 경우, 펄스처리에 의해 활성저해가 없음 |
| | | ○ PEF처리법을 포함하는 처리방법별 비교 연구 : 열처리, 가압처리, 초음파 처리법들과의 비교 | 100 | ○ 십자화과 모델식물인 무를 대상으로 열처리, 초고압처리, 초음파처리 수행 및 펄스처리와의 특성비교 |
| 2차 년도 (2015) | ○ 설 포 라 판 (Sulforaphane) 증폭을 위한 펄스에너지(PEF) 처리 조건 확립, 품종 및 제품별 비교 평가 | ○ 원료별 PEF 최적 처리 조건 확립과 우수 원료 제시 | 100 | ○ 무, 브로콜리 등 십자화과 식물에 대한 설포라판 등 기능성 대사체 분석 및 최적화 ○ 대사체 추출법 및 LC-MS 기반 대사체 분석법 확립 ○ 가공 처리에 따른 브로콜리 함유 활성 대사체 분석 및 다변량 통계분석을 통한 대사체 변이 분석 |
| | | ○ PEF chamber 공정 디자인 개발과 최적화 공정 가이드 제시 | 100 | ○ 연속형 펄스처리조 설계 및 제작 ○ 십자화과 식물의 연속형 펄스처리 적용 및 최적화 조건 적용 |
| 3차 년도 (2016) | ○ 설 포 라 판 (Sulforaphane) 증폭을 위한 펄스에너지(PEF) 처리 조건 확립, 품종 및 제품별 비교 평가 | ○ 브로콜리 기능성 증폭을 위한 PEF 연속공정 적용 및 에너지효율 분석 | 100 | ○ PEF 연속공정 적용 및 기능성분 대사체분석 ○ 연속형 PEF 처리의 에너지 효율 분석 |
| | | ○ 산업화 PEF chamber 공정의 검증을 통한 공정 재현성 및 가공적성 평가 | 100 | ○ 기능성이 증폭된 브로콜리의 초미세 분말화 ○ 초미세브로콜리분말의 식품가공적성 |

<제 3 세부기관 경기대학교>

| 구분 (연도) | 세부과제명 | 세부연구목표 | 달성도 (%) | 연구개발 수행내용 |
|------------|-------|--------|------------|-----------|
|------------|-------|--------|------------|-----------|

| | | | | |
|--------------------|--|---|-----|---|
| 1차 년도 (2014) | ○ PEF처리 십자 화과 식물들의 면역 및 항암활 성 비교 평가 | ○ 원재료와 PEF 처리된 십자 화과 식물의 면역 및 항암활성 비교 평가 | 100 | ○ <i>In vitro</i> 상에서 면역활성을 비교, 평가하여 고면역활성 식물을 선별 : Anti-complementary activity , Lymphocyte proliferation activity , Cytokine induction by macrophages , Intestinal immune system modulating activity |
| | | ○ 원재료와 PEF 처리된 십자 화과 식물의 면역활성 비교에 의한 고효성 식물 선별 | 100 | ○ 종양세포주에 대한 세포 독성을 비 교, 평가하여 고효성활성의 식물 선 별 ○ ① Cytotoxicity on cancer and normal cells ② 대상 종양세포주는 폐암 세포주와 대장암 세포주를 중심 으로 측정 |
| 2차년도 (2015) | ○ PEF처리 십자 화과 식물들의 면역 및 항암활 성 비교 평가 | ○ PEF 처리 십자화과 식물에 의한 <i>in vivo</i> 면역 및 항암활 성 평가 | 100 | ○ PEF 처리 십자화과 식물에 의한 <i>in vivo</i> 면역 및 항암활성 평가 : NK cell activity, Anti-metastatic activity, Effect of NK cell depletion on anti-metastatic activity, Effect of oral admin. on anti-metastatic activity |
| | | ○ PEF 처리 십자화과 식물 유 래 면역활성 성분의 작용 양식 해명 | 100 | ○ 대식세포 활성화 작용기전 연구 : 세포 신호전달 분자 MAPK (p38, ERK, JNK) 및 NF- κ B subunit p65 의 western blotting. |
| 3차년도 (2016) | ○ PEF처리 십자 화과 식물들의 면역 및 항암활 성 비교 평가 | ○ 가공제품으로부터 활성성분 의 분리, 함량 결정 및 지표물 질의 선정 | 100 | ○ 각종 가공식품으로부터 활성성분의 분리, 함량 평가 : 설포라판외에 타 활성 성분의 함량 결정, 순도 검정, 분자량 측정, 화학적 조성, 구성당 분 석 |
| | | | 100 | ○ 설포라판 이외의 활성의 지표물질 설정에 활용 |
| | | ○ 면역 및 항암 활성성분의 구 조, 화학적 특성 규명 | 100 | ○ 설포라판 이외의 면역 및 항암성분 의 분리 |
| | | | 100 | ○ 분리된 면역 및 항암 활성 물질의 구조, 화학적 특성 분석 : GC-MS, ESI-MS,MALDI-TOF, ESI-MS/MS |

제 5 장 연구결과의 활용계획

1. 실용화 · 산업화 계획

가. 시장확대 전략방향

(1) 체계화된 제품 생산 방향 설정

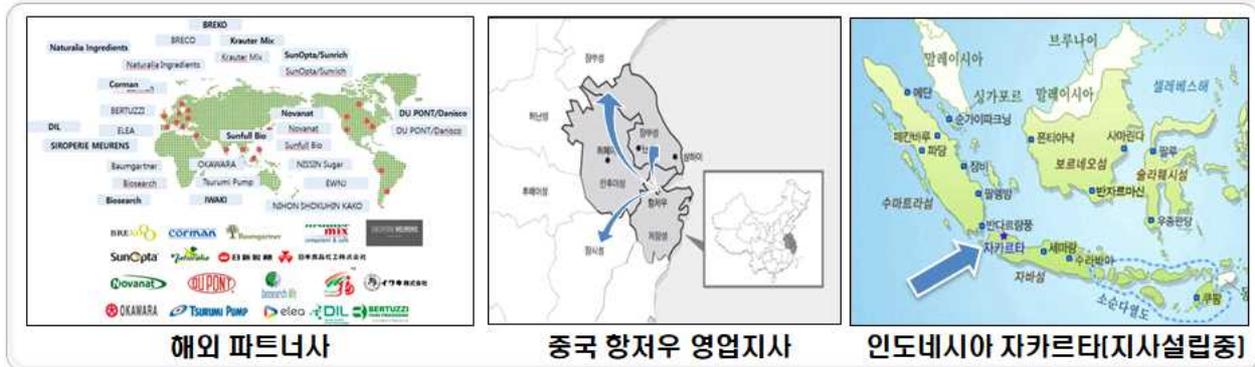
- 당사가 지금까지 진출하였던 주사업분야는 국내 식품 대기업 및 유가공회사에 주요 식품소재료를 납품하는 것으로 관련시장의 규모는 대단히 크지만, 성장의 한계는 분명 있다. 그에 따라 당사는 제주도 원물을 활용한 다양한 소비자용 제품 및 식품소재를 개발하여 신규 매출을 발굴하고자 함.
- 당사의 향후 3년간 추진하려는 분야는 냉장착즙주스, 유제품, 건강즙제품, 면역강화제품 시장임. 착즙주스 시장의 전체시장은 350억, 건강즙시장은 1조, 면역강화제품 시장 1조, 유제품시장은 5조의 시장을 형성하고 있음. 당사는 2017년부터 주력 제품을 출시할 계획으로 이전기간의 매출은 발생하지 않음.
- 냉장착즙주스의 경우 과거 상온 및 냉장 환원주스에서 최근 착즙주스로 트렌드의 변화를 가져오고 있음. 그로인하여 유통기한이 짧아지고, 원료에 대한 중요성도 부각되고 있음. 국내 주스시장의 매출규모는 감소하고 있지만 오히려 착즙주스의 전체 시장은 꾸준히 증가하고 있으며, 최근에는 패션의 한 아이템으로 광광을 받으면서 소비자의 관심도가 높은 품목임. 이에 당사는 청정하고 건강한 이미지가 강한 제주도 농산물을 그대로 착즙하고, 자체 비가열 살균 기술을 이용하여 디톡스개념의 냉장착즙주스를 시장에 내놓고자 함.
- 유제품의 경우 전체시장은 정체기에 있지만 최근 그릭요거트 및 플레인 요거트에 대한 관심이 높아지면서 시장이 큰 폭으로 증가되고 있음. 당사는 이 시기에 맞춰서 떠먹는 타입의 요거트 생산이 가능하도록 설비설치를 완료하였으며, 제주도 자원인 원유를 활용하여 100% 제주산 떠먹는 요거트를 시장에 진출시킬 준비를 하고 있음.
- PEF 처리에 의해 증폭된 sulforaphane은 열처리에 민감하여 비가열살균을 통한 sulforaphane 안정성이 확보된 제품을 출시하고자 함. 본 연구결과를 통해 개발된 PEF 처리된 브로콜리 푸레를 이용하여 냉동보관으로 제품을 출시하고, 소재 및 식품 개발로 추진하고자 함.
- 국내 건강식품 시장은 최근 5년 간 연평균 11.5%씩 지속적으로 성장하는 추세이고 그중, 40%의 시장이 면역기능 관련 제품이며, 2013 건식 5.2% 상승, 2014 1조 1920억 40%가 면역관련 제품인데, 가격 및 품질적으로 경쟁력있는 상품을 개발함으로써 시장

확대 가능함. 글로벌 항암제 시장은 연평균 15%씩 성장하고 있는 고속성장 시장으로서, 미국 사이언스 학술지에서 350억\$에 달하는 면역 치료제 분야를 가장 주목하고 있고, 세계적으로 면역관련 소재시장의 지속적 증가 및 매출 확대 예상되며 기존 항암제와 표적항암제의 부작용을 방지한, 인체의 면역 메커니즘을 이용해 암을 치료하는 면역항암제 시장이 발전(cf. 카터 전 미국대통령의 뇌종양 완치에 집중 적용방법)되고 있으며 국제적인 제약사들도 글로벌 빅파마들과 면역항암제 R&D개발 진행중이고 향후 부산물로부터 생산되는 면역다당을 경쟁력있게 제약화 함으로써, 면역제제의 국산화를 이루고, 해외 수출 및 라이선싱함으로써 시장점유율의 확대 예상함.

(2) 판로확보방안

- 국내외 PEF 기술을 통해 브로콜리의 sulforaphane 함량이 증가된 브로콜리를 개발한 사례는 전무함. 유사한 사례로 초고압 처리 기술을 통해 브로콜리의 세포벽을 파괴하여 sulforaphane이 생성할 수 있는 기술을 주관기관인 (주)비케이바이오에서 지식재산권을 소유하고 있음. 국내외 브로콜리 농산물 시장에 대응하여 개발된 브로콜리(슈퍼콜리)의 경쟁력은 상당할 것이라고 판단됨. 브로콜리의 생산은 강원도와 제주도가 대부분을 차지하고 있으므로, 가능성이 향상된 브로콜리를 농산물 시장에 우선 진입하고자 함.
- 해외사업 지속시장을 위해 최근 제주 관광 시장이 급성장하고 있는 중국, 일본, 인도네시아, 동남아 등의 신마켓 대륙에 집중 판촉 전략을 수립하고, 기하급수적으로 증가하는 해외 관광객에게 적극 홍보하며, 동시에 현재 당 사가 기보유하고 있는 해외 유통라인을 적극 활용하여 시장 진출을 진행할 것임
- 2017년 사업 개시부터 제품포트폴리오를 구성하고 기존 네트워크를 이루었던 기업들과의 협업과 안정적인 판매망을 바탕으로 한 성장 기반을 마련할 것이며, 2018년부터 본격적인 제품 양산을 통해 신유통 시장을 중심으로 고급화 음료의 상업화를 통해 기업 가치를 극대화시켜 나갈 계획임
- 대학, 연구소, 협력업체, 대기업 등 외부 네트워크 활용 방안. 펄스에너지에 대한 원천 가공 기술을 보유하고 있는 독일의 베를린 공과 대학 및 세계 최초로 산업화 설비를 생산하는 독일 DIL 연구소의 Dr. Heinz, Dr. Stephan 과 지속적 교류 및 자문을 통해 국내 사업화 전문인력 양성 및 전략 수립에 대한 자문을 의뢰할 것임.

○ 국내/해외 고객 및 파트너를 활용하여 수요의사를 타진



| 2016 | 2017 | 2018 |
|--|---|---|
| 중국시장 공략 | 동남아시아 진출 | 수출시장 확대 |
| <ul style="list-style-type: none"> 중국 법인 적극 활용 오프라인 매장 입점 런칭 행사 및 시음회 CS 관리 전문 마케터 육성 중국시장용 디자인 개발 | <ul style="list-style-type: none"> 인도네시아 지사 설립 중 할랄 인증 국제박람회 참가 바이어 미팅 소비자 수요 조사 | <ul style="list-style-type: none"> 미국수출전문 인력 확보 미국관련 인증획득(FDA, NDA) 해외 영업 본부 개설 수출중심 경영 중국 외 지역 법인 개설 수출품목 다양화 기능성제품 수출 개시 |

- 국내 기업 영업망 : 당사 보유하고 있는 제주, 서울 영업팀의 고객사 대상
- 해외 영업망 : 당사가 보유하고 있는 아시아 유통망 활용 해외 협력사 대상
- 해외 기술이전 전문 파트너를 통한 기술수요자 조사
- 해외 파트너인 독일 DIL 연구소를 활용하여 해외 기술이전에 대한 기술마케팅을 추진하여 기술수요자 조사

○ 마케팅 추진방법

| 구분 | 추진계획 | 비고 |
|---------------|---|----|
| 시장조사 | - FGI 실시 | |
| 전시회 참가 | - 국내 식품전시회 참가 2건 | |
| 공급/유통 채널 개척 | - 조합의 1,100개 전문 냉장유통 고객센터 활용 - 특수거래처 유통 탐색 | |
| On-Line 홍보활동 | - 바이럴마케팅을 통한 고객 입소문 확장 - 온라인 포털 및 모바일, SNS 채널 활용 - 롤링보드, 텍스트 배너, 팝업 등 - 소셜커머스 판매를 통한 제품 인지도 확대 | |
| 유통채널 확대판매 | 특수거래처 판로개척 및 판매 | |
| Off-Line 홍보활동 | 시음행사 및 샘플링 | |

나. 주요 고객 현황

- 당사의 주요 고객은 국내 굴지의 식품대기업 및 유가공업체들로서 CJ, 풀무원, 오뚜기, 대상, 빙그레, 삼양식품, 서울우유, 남양유업, 연세유업, 매일유업, 오리온, 롯데 등 다수 임.
- 납품중인 소재의 종류도 50여 가지 이상으로서 분유, 요거트, 건강즙, 즉석밥, 면류, 주스, 건강식품, 디저트 등 매우 다양함.
- 또한 당사는 2014년 초부터 중국 절강성을 중심으로 한 중국내 현지법인을 설립하여 냉장 유통 channel을 구축한 상태로서 국내 유제품, 주스제품 등을 현지에 유통하고 있음. 중국에 거점을 마련한 것은 향후 당사의 완제품 판매망으로 적극 활용하기 위한 방책으로서 현재는 절강성뿐만 아니라 중국 전역에 걸친 유통채널까지 현지 유통업체와의 협력관계로 구축중임.
- 현재 브로콜리 다당 추출·정제 기술을 통해 기능성 다당체를 소재화하고 본 과제를 통해 면역증강 가능성을 탐색 및 효능을 평가하였음. 면역증강 기능성 식품소재 및 개별인정형 건강기능식품 개발을 통해 국내 시장 확대 및 해외 기능성 시장 진출이 가능해짐.

< 거래처, 수요처 현황 >

| 구분 | 주요고객 구분 | 총 매출 비중(%) | | | | | 납품(판매) 제품 |
|-------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------|
| | | '11 | '12 | '13 | '14 | '15 | |
| 국내 기업 | 롯데푸드(주) | 747 (10%) | 756 (9%) | 1,131 (13%) | 2,933 (16%) | 1,819 (23%) | 유산균혼합분말 외 |
| | (주)아모레퍼시픽 | 797 (11%) | 1,177 (14%) | 1,319 (15%) | 4,069 (22%) | 1,307 (16%) | 차카테킨 외 |
| | 남양유업(주) | 1,090 (15%) | 1,351 (16%) | 1,189 (13%) | 1,470 (8%) | 757 (9%) | 유산균가공품 외 |
| | 연세대학교 연세우유 | 444 (6%) | 513 (6%) | 456 (5%) | 885 (5%) | 417 (5%) | 검은참깨페이스트 외 |
| | (주)오뚜기 | 837 (11%) | 1,081 (13%) | 1,729 (19%) | 3,453 (19%) | 355 (4%) | 쌀미강추출물 |
| | 극동에이치팜 (주) | - | - | - | - | 347 (4%) | 베리혼합농축액 외 |
| | 서울우유협동 조합제2공장 | - | - | 432 (5%) | 816 (4%) | - | |

| | | | | | | | |
|--|-----|-------|-------|-------|--------|-------|--|
| | 소 계 | 3,915 | 4,878 | 5,256 | 13,626 | 5,002 | |
|--|-----|-------|-------|-------|--------|-------|--|

다. 시장확대 리스크 대응방안

- 친환경 녹색기술인 펄스전기장 기술을 활용하여 농산물의 기능성 물질 함량을 증가시키는 기술을 개발하고 개발된 기술을 활용하여 지식재산권 획득을 이루어 산업화하는 것을 목표로 하고 있음.
- PEF처리에 의한 설포라판 함량이 증폭된 브로콜리의 제조를 위한 방법은 국내 특허 출원 및 해외 특허 PCT(개별국-중국)출원을 통해 검증을 받은 바 있으며, PCT(개별국-미국)을 추가로 출원을 지원하여 자사의 수출 시장 판로를 개척하고자 함.
- 기존 특허는 식품분야에 설포라판을 증폭 시키는 방법을 효소 활성의 증대, 초고압을 통한 세포의 파괴, 포장방법 및 부형제 첨가를 통한 보존 기술에 치중되어 있으므로, PEF를 이용하여 물리적이고 에너지를 저감화하는 기술을 통해 설포라판을 증폭시키는 방향으로 연구를 진행하여 PEF처리 기술을 통한 기능성 브로콜리의 제조 기술에 대한 특허를 국내에 출원, 중국에 출원 완료하였으며, PCT(개별국-미국)출원도 충분히 등록 가능함.

< 단계별 미래 기술확보 목표 >

(단위 : 억원)

| 제품 | 미래 확보기술 | | 기술준비수준(Technology Readiness Level) | | | | | |
|-------------------|--------------|---------------|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | '14 | '15 | '16 | '17 | '18 | '19 |
| 천연 과일 농축차 | 펄스 에너지 (PEF) | 풍미최대화 가공기술개발 | - | 4 | 6 | 9 | 9 | 9 |
| | | 최적 살균법 개발 | - | 3 | 6 | 8 | 9 | 9 |
| | 저온박막농축 | 풍미최대화 가공기술 개발 | - | 4 | 7 | 9 | 9 | 9 |
| | 부산물 활용 | 식이섬유개발 | - | 3 | 4 | 6 | 8 | 9 |
| | 포장 | 풍미유지 포장법 개발 | - | 2 | 3 | 5 | 8 | 9 |
| 가능성 강화브로콜리 (슈퍼콜리) | 펄스 에너지 (PEF) | 기능성분 분석법개발 | - | 3 | 6 | 7 | 9 | 9 |
| | | 슈퍼콜리 생산 | - | 4 | 6 | 8 | 9 | 9 |
| | | 응용제품 개발 | - | 3 | 4 | 6 | 8 | 9 |

* : 실험단계(3,4), : 시작품(5,6), : 제품화(7,8), : 사업화(9)

라. SWOT 분석에 따른 성장전략 목표 및 도출

< SWOT분석에 따른 전략과제 도출 >

| | 강점 | 약점 |
|---|------------------------------------|-------------------------------------|
| | ○ 바이오소재 개발·유통 경험 | ○ 약한 브랜드 ○ 비숙련 생산·관리 실무인력 |
| 기회 | 강점강화 + 기회 포착 | 기회 포착 + 약점 보완 |
| ○ 타깃시장(중국·동남아·젊은 층 등)에서 제주(천연물) 브랜드 가치 상승 | ○ 제주 천연물 기반의 신 컨셉 제품 개발·공급 | ○ 천연물 소재 개발·생산·유통을 지원하는 전주기 협업체계 구축 |
| 위협 | 강점 강화 + 위협 극복 | 약점 보완 + 위협 극복 |
| ○ 범람하는 유사 천연물 브랜드·공장 | ○ ‘생산 거점(제주 공장)’의 브랜드화로 타사와 차별화 지향 | ○ 고객맞춤형 유연생산역량을 갖춘 ODM 생산역량 확보 |

바. 슈퍼푸드를 활용한 마케팅 전략

- 영양학 분야의 저명한 학자인 Steven G.pratt 박사는 ‘난 슈퍼푸드를 먹는다’라는 책을 통해 세계 장수 지역의 식단에 브로콜리, 토마토, 호박, 연어, 호두, 시금치, 블루베리, 귀리, 녹차, 오렌지, 콩, 대두, 칠면조, 요구르트 총 14가지 식품을 소개하였음. 이에 슈퍼푸드라는 말이 건강을 증진시키기 위한 건강 식품의 단어로 사용되기 시작함.
- 게다가 2002년 미국의 ‘타임지’에서 선정한 세계 10대 슈퍼푸드에 브로콜리를 포함하여, 전 세계인들에게 주목 받기 시작하였음.
- 슈퍼콜리 중 하나인 브로콜리와 주관기관인 (주)비케이바이오의 PEF 기술을 결합하여, 브로콜리의 유효성분인 sulforaphane 증가된 함량을 통해 국내외 소비자들에게 유통될 수 있는 방안을 모색중임.
- 2017년 09월 14~16일 동안 서울 COEX 1층에서 실시한 2017년 중소기업기술혁신대전

에 참가하여 ‘Pulsed electric field technology를 통해 유효성분이 증폭된 브로콜리(슈퍼콜리, Superccoli)’의 주제로 전시회에 참가하고, 본 과제를 통해 우수한 기술을 알리고자 하였음. 그 결과 중소벤처기업부 장관상을 수여함. 또한 다양한 전시회에 참가하여 PEF 처리 기술 및 sulforaphane이 향상된 브로콜리를 알리고자 함.

2. 추가연구 활용 계획

가. Sulforaphane 안정성이 확보된 살균공정 확립

- 열안정성이 낮은 브로콜리 내 sulforaphane을 지속적인 보존을 위하여 50~60℃ 이하의 살균 온도 조건을 요구함. 본 연구과제 종료 후 살균공정을 확립하기 위하여 주관기관인 (주)비케이바이오가 보유하고 있는 PEF 처리 기술을 통해 sulforaphane을 증가시키고 동시에 일반세균 및 병원성 미생물을 제어할 수 있는 기술을 연구중임.
- Sulforaphane을 증가시키기 위한 PEF의 전기장 에너지인 7~10 kJ의 에너지를 처리한 후 100 kJ 이상의 에너지를 주어 생물학적인 안전성을 증가 시키고자 함. PEF 전기장 처리의 최대 180 kJ까지 에너지 조절이 가능하며, 에너지 처리 기준에 따른 생물학적 안전성을 확보하고자 함. PEF 기술을 활용한 비가열살균 처리 조건은 처리하고자 하는 원물에 따라 에너지 세기가 달라지므로, 추후 안전성 확보를 위한 실험을 추가적으로 실시하고자 함.
- 과채류의 경우 토양으로부터 얻은 미생물이 다량으로 존재하여, 제품 생산공정 중의 오염으로 유발될 수 있음. 이에 주관기관인 (주)비케이바이오가 보유하고 있는 미산성수 생산 기기를 통해 초기 미생물을 제어할 수 있는 방안을 모색 중임.

나. 건강기능식품 개별인정형 준비 계획

- 본 연구개발과제의 종료 후에도 개발 농산물 및 소재(가공된 소재 및 추출된 다당)들에 대한 개별인정 취득을 꾸준히 진행할 계획에 있으며, 한국식품연구원의 인체적용시험 사업인 식품기능성평가 인체적용시험 지원사업을 통해 소비자 니즈에 따른 다양한 제형을 개발하여 출시할 예정임.
- 이와 관련하여 주관기관인 비케이바이오에서는 기술실시(펄스전기장(PEF)을 활용하여 설포라판 함량이 증가된 브로콜리 제조)를 진행 중이며, 해당 기술은 개별인정형 건강기능식품 신청을 위한 근거자료 및 제품 생산을 위한 기반자료로 활용 할 계획임.

제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

D-08

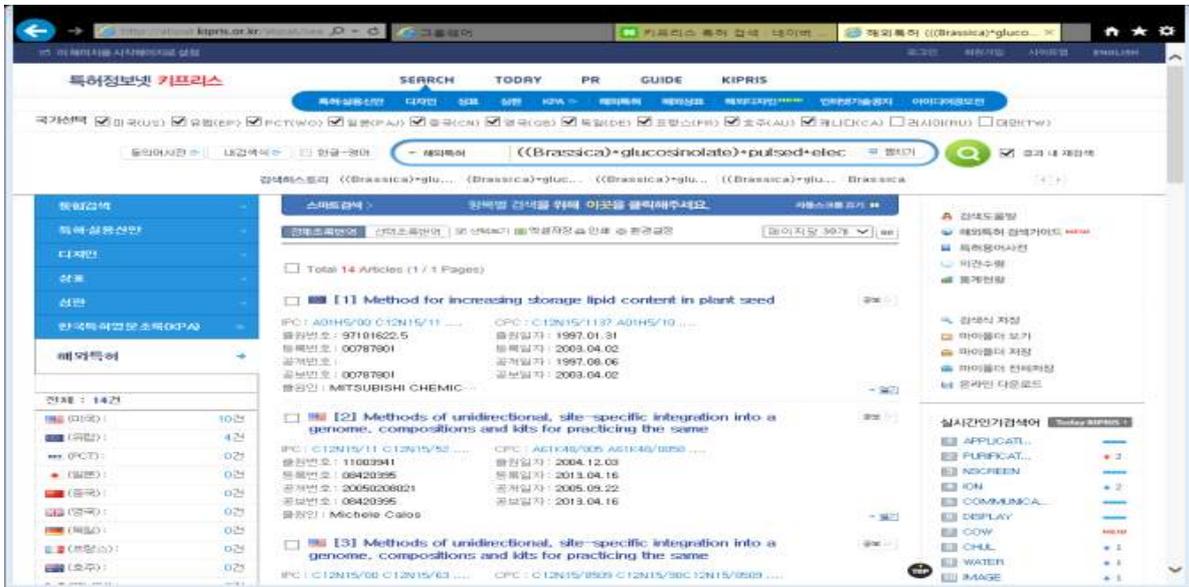
1. 본 연구관련 국내의 기술수준 비교

| 개발기술명 | 관련기술 최고보유국 | 현재 기술수준 | | 기술개발 목표수준 | 비고 |
|-----------------------------|---------------|---------|-------|--------------|----|
| | | 우리나라 | 연구신청팀 | | |
| 설포라판 증폭을 위한 PEF 처리 기술 | 독일, 한국 | 80 | 80 | 90 | |
| 면역증강 활성 검사 | 미국, 유럽 | 80 | 80 | 95 | |
| UPLC-MS/MS를 이용한 설포라판 함량분석기술 | 미국, 유럽 | 90 | 85 | 95 | |
| 고부가가치 기능물질의 제품화 | 일본, 유럽 | 60 | 50 | 80 | |

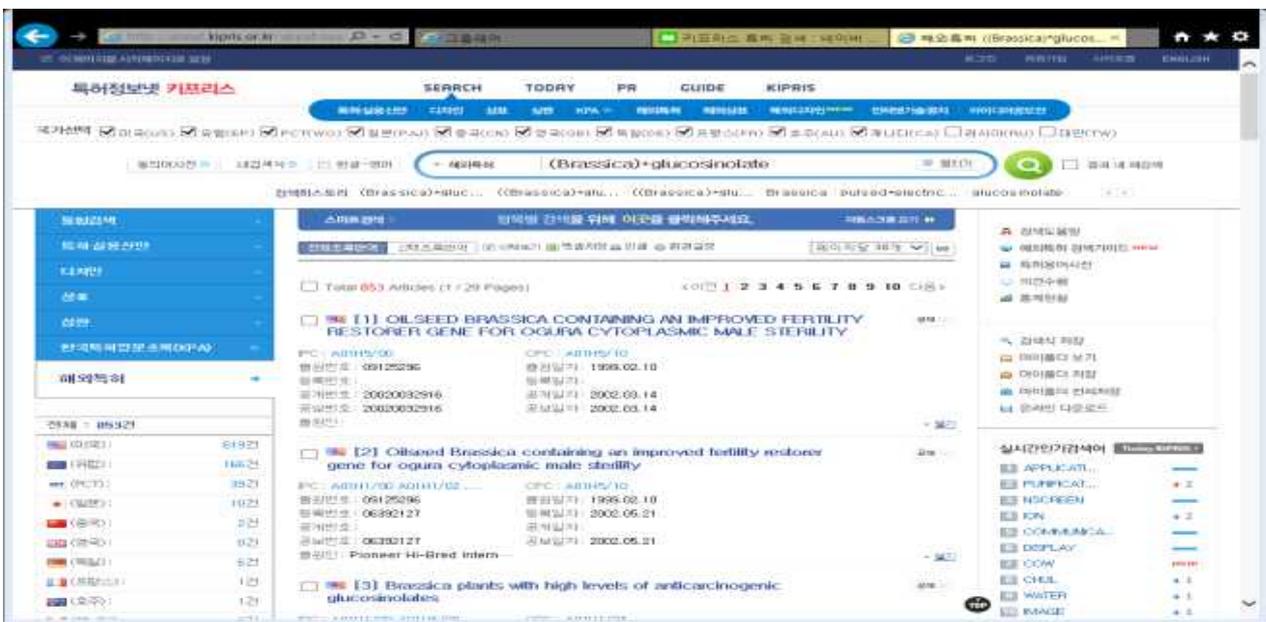
2. 특허분석

| 기술명 | PEF를 이용한 십자화과의 기능성분 증폭기술 | 십자화과의 기능성분의 제품화 | |
|------------------|---|--|--|
| Keyword | Brassica, glucosinolate pulsed electric field | glucosinolates, Brassica, | |
| 검색건수 | 해외 14, 국내 2 | 853 | |
| 유효특허건수 | 3 | 14 | |
| 핵심특허 및 관련성 | 특허명 | Pulsed electric field enhanced of extraction | Stabilized sulforaphane |
| | 보유국 | 미국 | 프랑스 |
| | 등록년도 | 2012 | 2011 |
| | 관련성(%) | 30% | 60% |
| | 유사점 | PEF를 이용하여 유용성분의 양을 증가 | 열에 약한 기능성물질을 저장, 유통가능하도록 안정화함. |
| | 차이점 | 단순히 추출율을 높이는 것과 달리 효소반응을 촉진시키는 점 | 화학합성을 이용하지 않고 물리적 방법과 포장등의 방법을 이용하여 식품 및 식품소재로서의 제품 개발 |
| 핵심특허 및 관련성 | 특허명 | 초고압처리를 통한 십자화과 채소의 활성 성분 증폭하는 방법 | Sulforaphane stabilization |
| | 보유국 | 대한민국 | 미국 |
| | 등록년도 | 2011 | 2013 |
| | 관련성(%) | 60% | 70% |
| | 유사점 | 십자화과 중의 글루코실레이트를 식품내에서 증폭 | 주 기능성분인 설포라판의 안정성 증대함. |
| | 차이점 | 압력으로 인한 물리적 손상이 없이 | 설포라판 함량을 0.01-15%정도로 다른 |

| | | | |
|------------------|--------|---|--|
| | | 진압으로 식품내에서 기능성분을 증폭시킴. | 부형제등을 첨가하여 이용하였으나 본 연구에서는 PEF를 이용하여 식품소재 및 식품으로 개발. |
| 핵심특허 및 관련성 | 특허명 | 초고압처리를 통한 십자화과 채소의 활성 성분 증폭방법 및 상기 방법으로 처리된 십자화과 채소 | Prevention and treatment of oxidative stress disorders by glutathione and phase II detoxification enzyme |
| | 보유국 | 대한민국 | 미국 |
| | 등록년도 | 2010 | 2012 |
| | 관련성(%) | 70% | 60% |
| | 유사점 | 십자화과 중의 글루코실레이트를 식품내에서 증폭한다는 점 | 글루코실레이트를 세포내에서의 레벨을 높인 점 |
| | 차이점 | 압력으로 인한 물리적 손상이 없이 진압으로 식품내에서 기능성분을 증폭시킴. | 의약품제형을 위한 조성 및 해독작용이 있는 약제기로 이용하였으나 PEF를 이용하여 식품내의 글루코실레이트를 증폭한 식품 및 식품소재의 개발하고자 함 |



<PEF를 이용한 십자화과의 기능성분인 글루코실레이트에 대한 해외 특허 검색 화면>



< 십자화과의 기능성분인 글루코실레이트에 대한 해외 특허 검색 화면 >

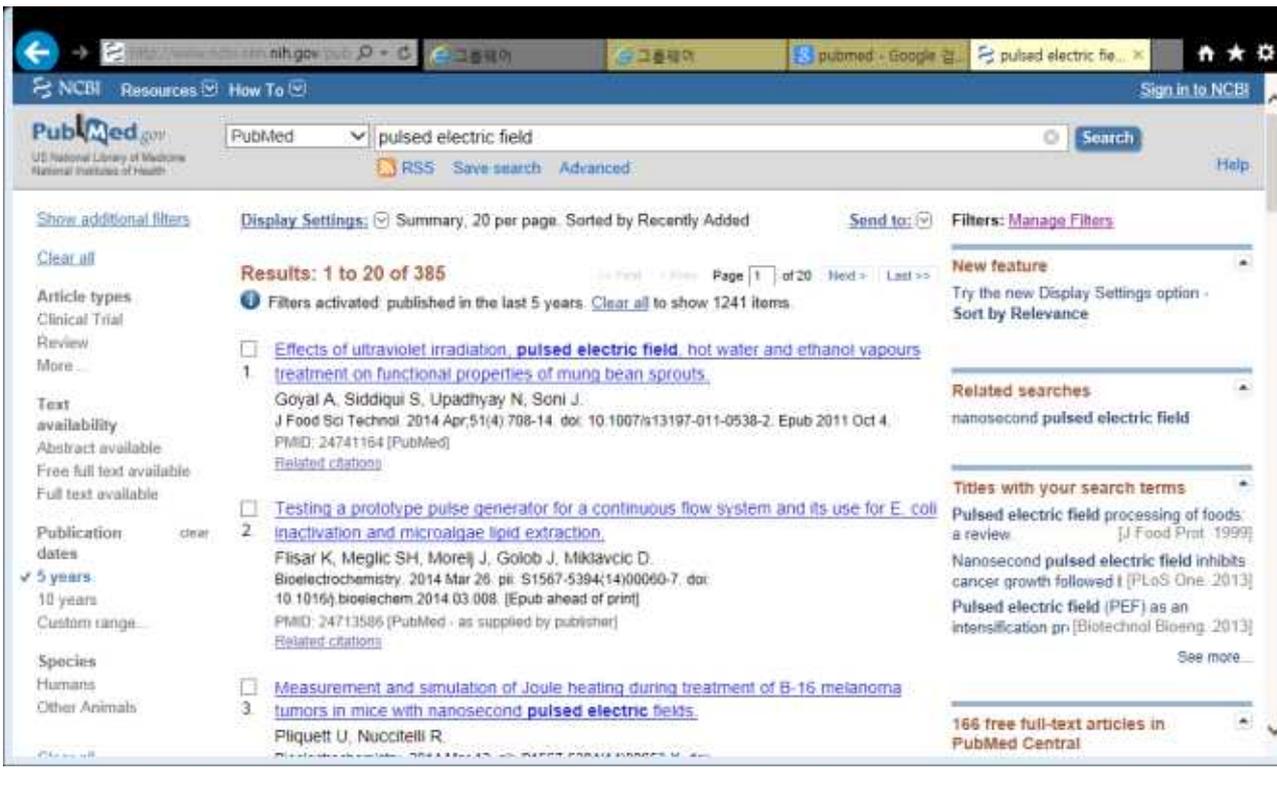
3. 논문분석

논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

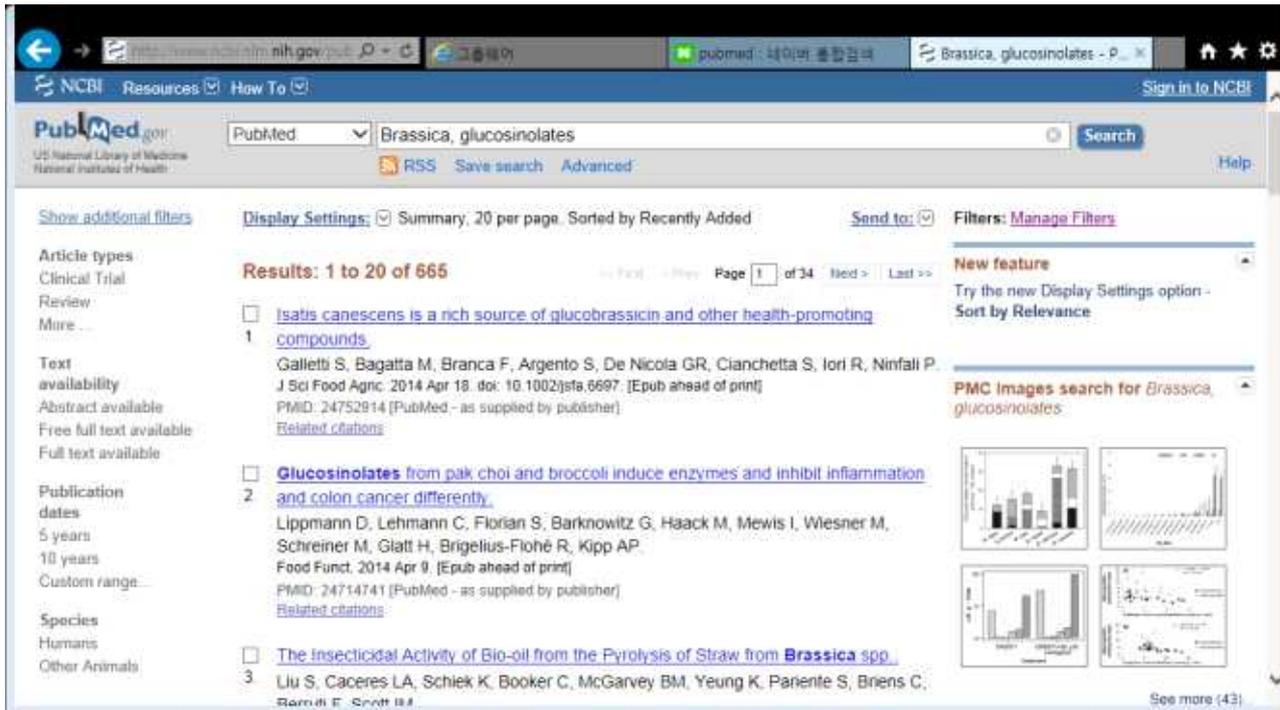
| 기술명 | PEF를 이용한 기능성분 증폭기술 | 십자화과 기능성 성분의 제품화 | |
|---------------|--------------------------|--|--|
| Keyword | Pulsed electric field | Brassica, glucosinolates | |
| 검색건수 | 385 | 665 | |
| 유효논문건수 | 13 | 20 | |
| 핵심논문 및 관련성 | 논문명 | 초고압가공법에 의한 십자화과 채소류의 설폴라판 함량 변화 | Study on degradation kinetics of sulforaphane in broccoli extract |
| | 학술지명 | 강릉대 학위논문 | Food Chemisty 155 (2014) 235-239 |
| | 저자 | 김세민 | Yuanfeng Wu et al. |
| | 게재년도 | 2009 | 2014 |
| | 관련성(%) | 70 | 40 |
| | 유사점 | 물리적 기술로 기능성분을 증폭 | 십자화과의 기능성분인 브로콜리에 대한 안정성을 검토 |
| 차이점 | 초고압기술이 아닌 고전압자기장기술을 이용함. | 십자화과의 기능성분을 추출하지 않고 원물상태에서 기능성분을 증폭함. | |
| 핵심논문 및 관련성 | 논문명 | Impact of PEF and thermal processing on apple juice shelf life | Stability and encapsulation efficiency of sulforaphane microencapsulated by spray drying |
| | 학술지명 | Iranian J. Microbiology 3 (2013) 152-155 | Carbohydrate Polymers 102 (2014) 497-503 |
| | 저자 | Torkamani AE | Yuanfeng Wu et al. |

| | | | |
|--|--------|-------------------------|--|
| | 게재년도 | 2011 | 2014 |
| | 관련성(%) | 70 | 70 |
| | 유사점 | PEF를 이용하여 원물의 기능을 향상시킴. | 설포라관을 이용한 건강기능소재 및 제품으로 활용. |
| | 차이점 | 쥬스가 아니라 원물의 기능성을 증폭시킴. | 열에 약한 성질을 고려하여 spray drying이 아닌 freeze drying, 포장등을 이용함. |

| 기술명 | | PEF를 이용한 기능성분 증폭기술 | 십자화과 기능성 성분의 제품화 |
|------------------|--------|--|--|
| 핵심논문 및 관련성 | 논문명 | Effect of pulsed electric field on the germination of barley seeds | Effect of Novel Processing Techniques on Glucosinolates and Membrane Associated Myrosinase in Broccoli |
| | 학술지명 | LWT-Food Science and Technology 47 (2012) 161-166 | Pol. J. Food Nutr. Sci. 64 (2014) 17-25 |
| | 저자 | Katarzyna Dymek et al. | Heidi Blok Frandsen et al. |
| | 게재년도 | 2012 | 2014 |
| | 관련성(%) | 40 | 80 |
| | 유사점 | PEF를 처리하여 원물의 효소 작용을 도움. | PEF로 브로콜리쥬스등에 이용함. |
| | 차이점 | 발아과정에 영향을 주는 것이 아니라 myrosinase의 activity를 증가하여 기능성성분을 증폭함. | 브로콜리의 원물이 아닌 푸레, 쥬스를 PEF 처리. 이미 myrosinase활성이 증폭된 것을 PEF로 처리하였음. |



<PEF에 대한 논문 검색 화면>



<Brassica와 glucosinolates에 대한 논문 검색 화면>

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

(1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내 대표적인 십자화과 식물인 브로콜리의 주요 재배지역은 제주도와 강원도, 충청북도이며, 각각 전체 재배면적의 약 73%와 9%, 8%를 차지함(제주도 농업기술원).
- 전국 재배 면적 및 생산량의 경우 제주도내 22, 532톤을 생산되고 있으며, 그 밖에 강원도 및 충청지역에서 수천톤 수준으로 재배하고 있음.
- 브로콜리의 가격 동향은 도매 기준 한상자 8kg에 평균 20,000원 수준으로 거래 되고 있으며, kg 당으로 최소 2,500원에서 최대 8,000원에 거래되고 있는 실정으로(가락시장 홈페이지 농산물 거래 단가 정보 참고), 국내의 농산물로서의 시장 규모는 약 700억/년 수준으로 형성되어 있음.



<그림> 지역별 브로콜리의 재배 면적 및 생산량

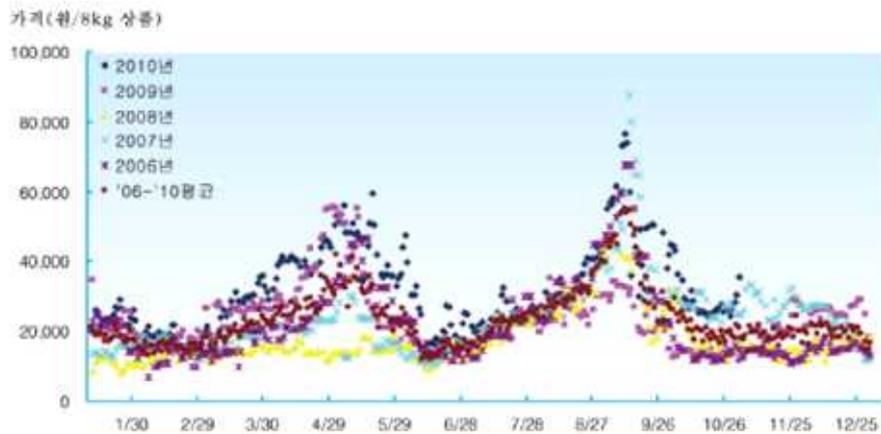


그림 4. 연도별 브로콜리 경락가격(2006~2010년)

※ 자료출처 : 서울시 농수산물공사 유통정보 데이터베이스

<그림> 연도별 브코콜리의 경락 가격 추이표

- 해외 수입품의 경우 중국, 대만, 미국산이 있으며, 주로 중국산 냉동 제품이 시장에서의 유통이 활발함. 특히 식자재용 저가의 제품으로 소비되고 있음.
- 국내산 국내 가공현황의 경우 단순 분말 제품류, 착즙액류, 비타민, 쿠키, 초콜릿, 미숫가루, 장아찌 등 다양에게 적용되고 있으나, 대규모 가공식품으로 개발한 미진한 상태이며, 화장품 원료로의 사용이 활발히 지고 있는 상황임.



○ 국내외 천연식품 유래 기능성소재에 대한 시장은 급속도로 확대 성장하고 있음에 따라 국내 기능성식품소재산업의 지속적 성장 및 선진화를 통한 세계 시장으로의 확대를 모색하고, 환경 친화적이며 안전한 방법으로 기능성식품 소재를 생산하기 위한 대응책 마련이 시급함. 2010년도 건강기능식품의 세계 시장규모는 약 3,000억 달러, 국내시장은 25억 달러로 세계시장 규모의 0.8% 수준임. 국내 건강기능식품의 2011년 매출액은 13,682억 원으로 전년 10,671억 원 대비 28.2% 증가하였으며, 특히 홍삼관련 제품은 7,190 억 원으로 52.6%를 차지함[식품의약안전청, 2012.5.9].

○ 대표적인 면역 증강 식품인 인삼은 세계적인 건강식품이며, 생산과정에서 유효성분이 증대될 수 있어 매우 큰 고부가가치를 가짐. 세계시장은 기능성식품에 대한 수요증가로 인하여 인삼시장이 확대되고 있는 추세이며 세계 각국은 인삼산업 육성에 주력하고 있음. 특히 중국은 세계인삼시

장의 67%를 점유하고 있으며, 한국은 약 20% 정도에 그치고 있음. 그리고 아시아를 넘어 캐나다, 미국, 호주, 독일 등 세계 각국에서도 최근 생산량이 매우 급증하고 있는 추세임.

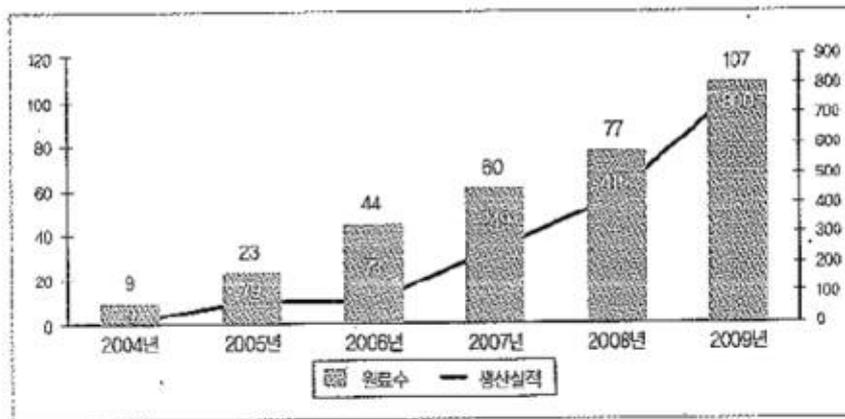
- 우리나라 농산물 수출 총액은 매년 신장되어 1995년 대비 2008년 실적이 330% 배의 신장률을 보이고 있는데 비하여 브로콜리는 국내 수요가 많아 수출이 진행되고 있지 않은 실정임.
- 따라서 우리나라의 십자화과 식물을 기능적으로 차별화 하여 중국, 유럽과는 셀포라판이 증대되어 있는 특징을 가지므로, 우리나라 십자화과를 이용한 가공품의 대량생산 및 유효성분 추출을 확대하여 국제경쟁력을 강화할 필요가 있음.
- 국내 건강기능식품 시장은 2009년 12,000억원 규모이며, 면역활성 가능성이 있는 홍삼 제품군이 꾸준히 많이 생산되고 있고 2009년부터는 개별인정형 건강기능식품의 생산이 2위로 높아지는 추세임.
- 2009년 건강식품생산실적을 보면 홍삼, 개별인정, 비타민 순으로 나타나고 있으며 개별인정 초강세, 비타민/미네랄의 상승 반전, 인삼과 알로에의 하락세와 같은 추세를 보이고 있음.
- 개별인정의 경우 2006년에는 생산실적 100억원 규모였으며, 홍삼, 비타민, 알로에, 글루코사민에 그늘에 가려 활성화되지 못하다가, 2007년에 개별인정절차가 간소화되고 CLA라는 메가 아이템이 발굴이 되어 생산실적 249억원 규모를 증가함. 이후 2008년 생산실적 416억원, 2009년 생산실적 800억원으로 매년 2배 가까운 성장세를 보이고 있음.
- 비타민/미네랄의 상승 반전이 특징인데, 2005년 이후 하락세를 보이다가 2009년 43% 신장하여 2005년 수준 회복하는 반전의 시장을 형성하고 있음. 이는 건강기능식품 신공전(2008년 개정)에 의해 비타민/미네랄 품목의 기능성 표현의 구체화/다양화되고, 제형도 다양화되어 다양한 품목개발이 된 것이 가장 큰 원인이며, 여기에 신종플루로 인한 기초 영양원에 대한 수요가 부활되어 면역, 비타민D, 항산화, 피로회복등의 수요가 확대된 것으로 분석됨.
- 인삼과 알로에의 하락세의 경우가 특이하게 주목할 만한 상황인데 알로에는 2006년 이후 하락과 정체를 보이고 있다. 2007년과 2008년에는 하락세였으나 신종플루로 인해 2009년에 1% 성장하는 것으로 선전을 하였으나 다시 시장 확대가 되는 것에는 한계가 있는 것으로 판단되고 있음. 인삼의 경우도 2009년 생산실적 전년대비 12% 하락하였으며 홍삼과 비교하여 판매 소구점이 낮다는 것이 그 이유임.
- 한국 건강기능 식품이 동향과 전망을 요약하면, 현재까지는 판매 상승 상위 5위 품목이 70~80% 점유하고 있으나, 다양한 개별인정 시장의 상승세로 인해 쏠림현상 완화가 기대되며, 우리나라 건강기능식품시장의 다양한 방식으로 성장 가능성을 기대하고 있음. 예로 우량 개별인정 소재인 CoQ10, 루테인, 쏘팔메토 등이 고시형 전환, 주도 품목 전환이 기대 된다고 판단되어, 몇몇 일부 유행품목에 의해 시장이 움직이는 틀에서 벗어나는 형태로의 변화를 통해 다양한 제품이 다양한 방식으로 경쟁하는 건전한 시장으로 발전 기대된다 할 수 있음.

표 1. 건강기능식품 생산실적 상위 10품목 현황

출처 : 식약청

| 순 | 품목 | 판매액(억원) | | | | 증가율 (09/08) |
|----|-----------------|---------|-------|-------|-------|----------------|
| | | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | |
| | 총액 | 7,008 | 7,235 | 8,031 | 9,598 | △ 20 |
| 1 | 홍삼 | 2,469 | 3,284 | 4,184 | 4,995 | △ 19 |
| 2 | 개별인정형 | 73 | 249 | 418 | 800 | △ 92 |
| 3 | 비타민 및 무기질 | 636 | 604 | 531 | 761 | △ 43 |
| 4 | 알로에 | 1,031 | 797 | 639 | 648 | △ 1 |
| 5 | 인삼 | 364 | 348 | 413 | 364 | ▽ 12 |
| | 5품목 누적 | 4,572 | 5,283 | 6,183 | 7,568 | △ 22 |
| 6 | 노폐가-3 지방산 함유 유지 | 152 | 142 | 266 | 334 | △ 25 |
| 7 | 프로바이오틱스 | 168 | 174 | 190 | 254 | △ 33 |
| 8 | 글루코사민 | 368 | 275 | 201 | 188 | ▽ 17 |
| 9 | 식이섬유(보충용) | 207 | 159 | 145 | 154 | △ 6 |
| 10 | 호모 | 184 | 146 | 179 | 128 | ▽ 29 |
| | 10품목 누적 | 5,651 | 6,179 | 7,164 | 8,602 | △ 20 |
| 11 | 기타품목 | 1,357 | 1,056 | 867 | 996 | △ 15 |

그림 1. 개별인정 원료건수 및 생산실적 현황 (단위 : 건, 억원)



- PEF 기술의 경우 관련 기술들의 개발 및 산업화는 유럽 및 미국에서 활발히 수행되고 있으나, 국내의 경우 가공 설비 및 산업화 처리 기술이 전무하여 전 분야에 걸쳐 설비 및 관련 기술을 도입 또는 라이선싱 하고 있는 실정임.
- 즉, 펄스전기장 가공 기술은 국내의 경우 아직 산업화 적용에 대한 연구가 미진한 실정이며, 일부 대학에서 실험실 규모의 단순 처리 장치를 가지고, 비연속식으로 처리하는 수준의 규모로 연구되어 왔으나, 2011년 주관기관에서 batch형 pilot설비 도입 및 산업화 적용에 대한 응용 기술 개발하여 녹색 기술로 인정받아, 기술 응용 제품 개발에 연구 투자를 촉진하고 있음.

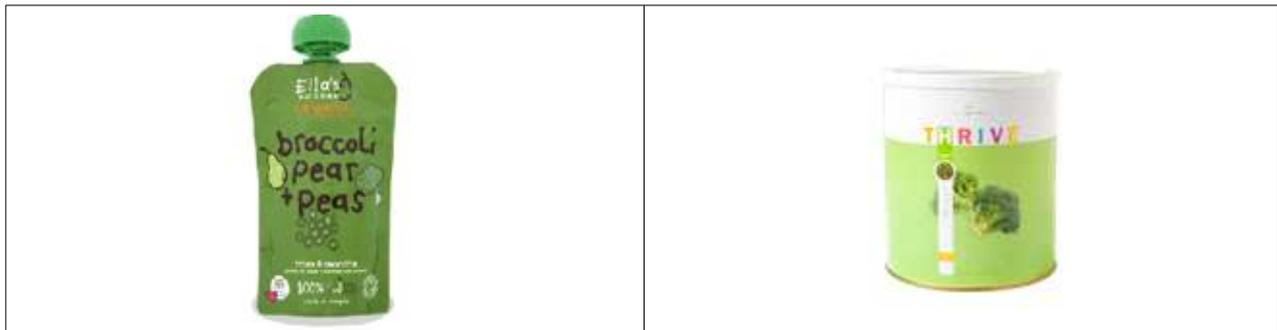
나. 국외 제품생산 및 시장 현황

- 해외에서의 십자화과 식물들은 샐러드의 형태로 다양하게 섭취하고 있으며, 우리나라의 김치와 같이 발효 식품으로도 오래전부터 섭취하고 있는 상황임.
- 해외에서는 브로콜리, 당근, 양배추 등을 잘게 썬 Cole slaw(콜슬로) 제품이 많이 판매되고 있음.

*액상 제품



| |
|---|
| <p>Super sprout (슈퍼스프라우트) - 호주 -제품명: 브로콜리 새싹 파우더 -제조원: JUICES INTERNATIONAL PIY LTD</p> |
|---|



| | |
|---|---|
| <p>Ella's Kitchen - 영국 -제품명: Broccoli, Pear & Peas -제조원: Ella's Kitchen</p> | <p>THRIVE - 미국 -제품명: Freeze Dried Broccoli -판매원: THRIVE</p> |
|---|---|

*냉동 건조 제품 - 수분 3% 이하(수입원: 신세계푸드)



| | | |
|----------------------|------------------------|---------------------|
| <p>Waitrose - 영국</p> | <p>Bird's eye - 미국</p> | <p>HORTEX - 폴란드</p> |
|----------------------|------------------------|---------------------|

* Cole Slaw 제품



MANN'S - 미국

-제품명: Broccoli Cole Slaw

콜슬로(양배추, 당근, 양파 등을 채 썰어 마요네즈에 버무린 샐러드)

-용량: 340g (4인분 / 5인분)

-특성: 브로콜리, 당근, 붉은 양배추를 잘게 썰어 파스타, 샐러드, 타코 등에 넣어 먹는 제품

- 지중해를 중심으로 하는 유럽에서 주로 재배 및 섭취를 하며, 생물이외에 IQF 급속 냉동 제품 등의 대량 생산을 위한 가공기술이 최신화 되어 있음.
- 아시아의 경우 중국에서 다량 생산되어 저가의 제품으로 국내 및 일본 등지로 수출되고 있으나 품질력은 낮은 것으로 알려져 있으며, 일본의 경우 가공품 생산 및 가공 기술이 유럽의 수준까지 높아진 것으로 알려져 있음.
- 세계 기능성 식품 시장은 2007년 3,771억 달러(2002년 대비 86%)증가로 예상되며, 우리나라의 경우 2009년 신종플루 유행으로 건강기능식품 중 면역력 강화효과가 있는 홍삼 제품의 판매가 기하급수적으로 증가하였음.

< 연도별 기능성식품 시장현황 >

| 년도 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2007 |
|-----------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 시장 규모 (억 달러) | 650 | 1,090 | 1,280 | 1,380 | 1,501 | 2,023 | 3,771 |

(출처 : Nutrition Business Journal 2003 Food Technology USA, 2003)

- 건강기능식품의 세계 시장 규모는 1997년 650억불에서 2002년 2,023억불, 2007년 3,771억불로 2002년 대비 86% 증가 추세를 나타냄.
- 미국의 경우 2005년 41억불(2000년 대비 80% 이상 성장) 규모로 시장 규모는 비타민, 미네랄 등의 영양 보충제 시장이 주요 제품군이며, 시장의 성장은 다이어트 컨셉이 강세를 보이고 있음. 2009년 기준으로 52억불 규모의 시장을 가지며, 유기농 시장 강세(17.8억불), 다이어트 시장 급상승(7.1억불), 스포츠음료(9.9억불), 영양보충제(17.2억불)이 현재 주요 시장 추세임.
- 유럽의 경우 특정질환을 타겟으로 제품개발이 발전되어 있으며, 주요 제품 형태는 발효유, 마가린, 씨리얼 형태로 발달되어 있음. 주요 국가별로 영국은 에너지 충전, 뼈건강, 치아, 유방암, 콜레스테롤 저하 순으로, 프랑스는 에너지 충전, 콜레스테롤, 질환저항성 증가, 면역, 변비 순으로, 독일은 면역, 뼈건강, 치아, 에너지, 소화기 순으로 수요가 형성되어 있으며 독일의 경우 2006년도 기준 바이오식품 지출액 35억유로 규모로 파악되고 있음.

- 일본의 경우 1969년부터 성장한 건강기능식품 분야의 선진 개발국으로 초기 보건기능식품 중 특정보건용도식품으로 유산균 관련 제품(음료)이 주도했으나 2003년부터 축소되어 치아건강 껌, 콜레스테롤 저하 기능성 식용유, 혈당 및 체지방 감소 다류(녹차) 제품군 급신장하는 추세임. 일본의 경우 1개 품목으로 100억엔 이상 매출 초과 경우도 있었음. 최근에는 녹차와 같은 다류 제품군에서 미네랄워터, 야채음료군으로 판도 변화되면서 미용 식품 등으로 품목이 다양화 되는 추세임. 2007년 기준 5조141억엔 규모의 시장을 형성하고 있음.
- PEF기술의 경우 산업적으로 독일, 네덜란드, 영국 등 유럽 및 미국을 중심으로 산업화에 적용이 되어 신선 주스, 스무디 등의 음료에 적용이 활발히 진행되고 있으며, 최근 감자, 고구마, 당근 등의 서류 및 야채류 농산물의 전처리 공정에 적용되고 있음. 대표적인 산업화 사례는 Hoogesteger(NL), FruityKing(NL), Wernsing GmbH(German), Cosun(NL), Orchard House(UK), Lassonde(Canada), Uelzena(Germany), Simplot(USA) 사임.
- 특히 감자의 경우 2013년도 미국 냉동감자 생산 수출량은 92만 6,553톤으로 용적으로2% 증가되었고, 10억 4,872만 8,731달러로 가치는 6% 증가함. 이는 냉동감자 생산 수출 역대 최고의 기록으로 10억 달러 이상의 기록을 세운 것임. 수출량은 양적으로4% 증가되었고, 멕시코 28% 증가, 대한민국 8% 증가, 말레이시아 8% 증가, 베트남 15% 증가에 인한 것이며, 이러한 시장 확대에 펄스 전기장 기술이 도입되어 시장 확대에 많은 영향을 끼치고 있다고 판단됨.
- 유럽과 미국을 중심으로 농산물 처리, 음료의 살균 기술에 대한 연구가 활발하고, 산업화가 완료되어 기술이 적용된 제품들이 출시되고 있고, PEF 처리를 한 대부분의 식품은 기존의 열처리 공정을 거친 식품과 품질 비교를 하였을 경우 거의 차이가 없거나 우수한 것으로 평가되고 있음.

제 7 장 연구개발결과의 보안등급

| | |
|--|------|
| | D-09 |
|--|------|

- | |
|--|
| ○ 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 따른 분류에 따른 일반과제 |
|--|

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

| 구입 기관 | 연구시설/ 연구장비명 | 규격 (모델명) | 수량 | 구입 연월일 | | | D-10 | |
|-------|----------------|-------------|----|--------|---------------|---------------|------------------|----------------|
| | | | | | 구입 가격 (천원) | 구입처 (전화번호) | 비고 (설치 장소) | NTIS장비 등록번호 |
| | | | | | | | | |

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

D-11

<제1세부기관(주관) : (주)비케이바이오>

- 후드 및 환풍기를 설치하여 유기용매 등의 유해성분을 효율적으로 실외로 배출하고 있으며, 실험에 사용될 유기용매는 사용 전 구입, 공수, 사용 후 별도 수거하여 적절한 폐기절차를 거쳐 폐기하고 있음.
- 기타 구급상자, 고글, 마스크, 보안경, 소화전 등 실험시 발생할 수 있는 위험요소로부터 연구원을 보호해 줄 안전장비를 비치하고 있음.
- 또한 연 2회의 실험실 안전교육 이수율 의무화하고 있으며 매년 1회 종합건강검진에 연구원들이 자발적으로 참여함.
- 당사의 연구실은 연구실 안전환경 조성에 관한 법률에 따라 적합한 소방 기구 설치를 완료함.
 - 소방 기구는 실험 기자재의 피해를 최소화 하도록 하는 HCFC123 형식의 소화기를 비치함.
 - 실험실을 포함한 회사 전체에 대해 생산물 배상 책임 보험에 가입되어 있음.

<제2세부기관(협동) 중앙대학교 산학협력단>

1. 연구실 안전관리 개요

- 교내 연구실 안전사고를 예방하고 연구실의 안전성을 확보하고자 연구실안전관리규정에 의거 연구실 정기점검 및 정밀안전진단실시, 연구활동 종사자의 교육 및 검진을 통한 안전성 확보, 사고 발생 시 초동대응을 통한 인적, 물적 피해를 최소화 하고자함.

2. 연구실 안전관리 조직 및 담당업무

| 구 분 | 담당 업무 |
|------------------------------|---|
| 총장 및 부총장 | ○ 연구실 안전관리 총괄 |
| 연구환경 안전 관리자 (시설관리처 안전관리팀) | ○ 연구(실험)실 안전관리 총괄 관리 ○ 연구활동종사자 안전교육 운영 관리 ○ 상시 연구활동종사자 건강검진 진행 ○ 연구(실험)실 안전점검 진행 (정기점검, 정밀안전진단) ○ 관련법, 안전수칙 교육 및 홍보 ○ 범 이행사항 보고 외부 점검 수행 |
| 대학 연구환경 담당자 /학과담당자 | ○ 계열 연구(실험)실 안전관리 관리 ○ 연구활동종사자 안전교육 홍보 및 이수현황 관리 ○ 상시 연구활동종사자 건강검진 홍보 및 현황 관리 ○ 연구(실험)실 안전점검 관리(정기점검, 정밀안전진단) ○ 관련법, 안전수칙 교육 및 지도 ○ 각종 폐기물 처리 지침 준수 및 교육 |
| 연구실 안전 관리자 (정,부) | ○ 연구(실험)실 실별 안전관리 총괄 관리 ○ 연구활동종사자 안전교육 홍보 및 이수현황 관리 |

| | |
|--------------|--|
| | <ul style="list-style-type: none"> ○ 상시 연구활동종사자 건강검진 홍보 및 현황 관리 ○ 연구(실험)실 안전점검 대비 일지 작성 ○ 관련법, 안전수칙 교육 및 지도 ○ 각종 폐기물 처리 지침 준수 및 교육 ○ 위험물 및 유해인자별 MSDS 비치 및 교육 ○ 각종 폐기물 처리 지침 준수 및 교육 |
| (상시)연구활동 종사자 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 연구실 안전교육 및 건강검진 참여 ○ 연구(실험)실 안전점검 실시 ○ 각종 폐기물 처리 지침 준수 폐기 ○ 위험물 및 유해인자별 MSDS 확인 후 실험 |

3. 연구실 안전관리

가. 위험도에 따른 연구실 등급 관리

- (1) A등급 : 가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
- (2) B등급 : 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생실험실
- (3) C등급 : 이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

나. 연구실 정기점검 및 정밀안전진단

- (1) 일상 점검 : 연구실 안전 관리자 책임 하에 일일 및 월별 점검 실시하여 특이사항 안전 관리팀으로 보고
- (2) 정기 점검 : 연구실 등급에 따라 안전관리팀 주관 하에 교내 전체 연구실에 대한 안전점검을 실시하여 문제점 개선 조치(1회/년)
- (3) 정밀안전진단 : 외부 전문기관에 의뢰하여 교내 위험등급 A, B등급 연구실에 대하여 정밀안전진단을 실시하고 문제점 도출 및 개선 조치(1회/년)



다. 연구실 안전교육

- (1) 관련 근거 : 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제18조 및 연구실안전관리규정 18조(안전교육)에 의거 교내 연구활동 종사자에 대하여 교육 실시
- (2) 교육 대상 : 과학기술분야 학과(부)생 및 대학원생, 위험등급 A, B등급 연구실에 상시 근무하는 대학원 수료생 및 연구원
- (3) 교육 방법 : 재학생(학부생, 대학원생)은 일괄 등록되며, 위험등급 A, B등급 상시연구활동 종사자의 경우 학과에서 취합 후 안전 관리팀으로 대상 인원 제출
- (4) 교육 이수시간 : 학기당 6시간, 연간 12시간 이수해야 하며, 수료증 연구실 앞 게시

| 구분 | 교육 대상 | 시간 | 교육 내용 |
|----|--------------------------|----------|--|
| 정기 | (상시)연구활동종사자 | 6시간이상/학기 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 연구실 안전환경 조성 법령에 관한 사항 ○ 연구실내 유해·위험요인에 관한 사항 ○ 안전한 연구개발 활동에 관한 사항 ○ 물질보건 안전자료에 관한 사항 ○ 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항 |
| 특별 | 중대사고 및 필요시 (상시) 연구활동 종사자 | 2시간이상 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 연구실내 유해·위험 요인에 관한 사항 ○ 안전한 연구개발 활동에 관한 사항 ○ 물질안전보건자료에 관한 사항 ○ 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항 |

라. 연구실 건강검진

- (1) 관련 근거 : 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 시행규칙 제10조, 연구실안전관리규정 21조(건강검진)
- (2) 검진 대상 : 위험등급 A, B등급 연구실에 상주하는 상시 연구활동 종사자
- (3) 검진 방법 : 위험등급 A, B등급 연구실 유해인자에 따른 상시 연구활동 종사자 특수검진 실시 (매년)

마. 연구실 안전 보험

- (1) 관련 근거 : 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제14조, 연구실안전관리규정 20조(보험가입)
- (2) 보험 대상 : 과학기술분야 학과(부)생 및 대학원생, 위험등급 A, B등급 연구실에 상시 근무하는 대학원 수료생 및 연구원
- (3) 보험 보상 한도
 - 상해사망 : 1인당 1억원
 - 상해, 후유장애 : 1인당 1억원 한도로 장애등급별 정액 보상
 - 부상 : 1인당 1천만원 한도로 상해등급별 정액 및 실손 보상
- (4) 보험 청구 절차 : 연구실 안전 관리자가 연구활동 종사자에 대한 사고경위서 및 보험 청구서를 작성하여 안전 관리팀으로 제출하며, 안전 관리팀에서는 사고 경위 및 피해 상황을 검토하여 보험금 청구 및 안전조치 이행

4. 2015년 연구실안전관리 이행 계획

가. 연구실 위험등급별 조정 및 조정에 따른 환경 개선 조치

- 나. 연구실 환경개선공사 실시
- 다. 연구실 정밀안전진단 실시
- 라. 계열별 안전용품 수요조사를 실시하여 위험요소에 따른 안전용품 지급
- 마. 안전교육 우수학과 안전용품 포상
- 바. 연구실 실내 공기 질 측정 및 안전조치 시행
- 사. 15년 안전 업무 일정

| 일정 | 내용 | 세부사항 | 비고 |
|---------|------------------------|--|----|
| 매월 | Clean & Safety day 실시 | 매월 자체 안전점검 실시 안전점검 시 필요 사항 즉시 개선 | |
| 3월 | 1학기 연구종사자 집체교육 | 연구실 신규종사자 및 부안전관리자 대상 | |
| 4월~8월 | 1학기 온라인 안전 교육 실시 | 상시 종사자 및 학부 재학생 대상 | |
| 4월 | 연구실 정밀 진단 실시 | 시설관리팀 등 관련 부서 협조 | |
| 4월 | LMO 관련 생명안전책임자 선임 | 교육(8시간) 이수 | |
| 5월 | 연구실 정밀 진단 결과 개선 | | |
| 6월 | LMO 연구시설 점검 실시 | 서울캠퍼스 포함 | |
| 7월 | LMO 연구시설 진단 결과 개선 | 서울캠퍼스 포함 | |
| 7월~8월 | 연구실 안전관련 집기 설치 및 시설 개선 | 위험물보관함 등 안전관련 집기 수요 조사 비상세안기 등 시설개선 수요조사 후 실시 | |
| 7, 8월 중 | 연구실 안전위원회 회의 실시 | 연구실 안전관리지도(미래부) 점검 대비 | |
| 9월 | 2학기 연구종사자 집체교육 | 연구실 신규종사자 및 부안전관리자 대상 | |
| 10월 | 2학기 온라인 안전 교육 실시 | 상시 종사자 및 학부 재학생 대상 | |
| 9월 | 연구실 정기 안전진단 실시 | 외부 기관 의뢰 | |
| 9월 | 정기 안전진단 결과 개선 | | |
| 11월 | 연구종사자 건강검진 실시 | 일반, 특수 검진 실시 외부 기관 의뢰 | |
| 12월 | 연구실 안전관리 결과 개선 | | |

5. 연구실 안전조치 이행실적

가. 위험도에 따른 연구실 등급 관리

- 실험실 환경에 대해 정기안전점검 및 특별안전점검을 통해 위험 정도에 따라 A, B, C로 관리등급을 분류하여 점검결과 A등급(식품가공실험실(4109-2)), B등급(식품가공실험실(4108))으로 모두 안전기준 1등급 실험실로 분류되었음.



나. 연구실 정기점검 및 정밀안전진단

○ 연구실안전관리자 책임 하에 일일 및 월별로 연구실 정기점검을 실시하고 있음.

(별첨 1)

시험실 안전관리 점검표

점검일: 2016. 7. 1

연구실명(호실): 4109-2 연구실안전관리자(교수): 이동연 **서명**

| 영역 | 점검내용 | 점검결과 |
|--------|--|------|
| 연구실 관리 | 안전기준 안전관리에 대한 충분한 이해를 갖춘 상태로 근무하고 있는가? | ✓ |
| | 연구실내 화재경보기 및 소화기 등 안전시설이 작동하고 있는가? | ✓ |
| | 안전기준 안전관리 교육 이수 여부를 확인하고 있는가? | ✓ |
| 안전 교육 | 안전기준 내 안전수칙이 게시되어 있는가? | ✓ |
| | 교육내용에 대한 이해도를 위한 별도의 시험이 실시되어 있는가? | ✓ |
| 실험 안전 | 실험실 내 소화기, 방화차 등 안전시설이 작동하고 있는가? | ✓ |
| | 실험실 내 안전수칙이 게시되어 있는가? | ✓ |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | ✓ |
| 실험 관리 | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | ✓ |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | ✓ |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | ✓ |
| 기타 | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | ✓ |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | ✓ |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | ✓ |

(별첨 1)

시험실 안전관리 점검표

점검일: 2016. 7. 1

연구실명(호실): 4108 연구실안전관리자(교수): 이동연 **서명**

| 영역 | 점검내용 | 점검결과 |
|--------|--|------|
| 연구실 관리 | 안전기준 안전관리에 대한 충분한 이해를 갖춘 상태로 근무하고 있는가? | ✓ |
| | 연구실내 화재경보기 및 소화기 등 안전시설이 작동하고 있는가? | ✓ |
| | 안전기준 안전관리 교육 이수 여부를 확인하고 있는가? | ✓ |
| 안전 교육 | 안전기준 내 안전수칙이 게시되어 있는가? | ✓ |
| | 교육내용에 대한 이해도를 위한 별도의 시험이 실시되어 있는가? | ✓ |
| 실험 안전 | 실험실 내 소화기, 방화차 등 안전시설이 작동하고 있는가? | ✓ |
| | 실험실 내 안전수칙이 게시되어 있는가? | ✓ |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | ✓ |
| 실험 관리 | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | ✓ |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | ✓ |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | ✓ |
| 기타 | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | ✓ |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | ✓ |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | ✓ |

연구실 월별 안전점검표

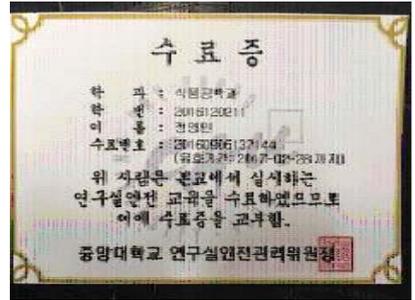
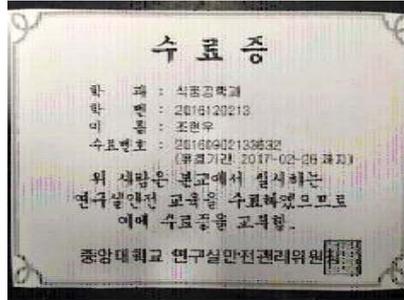
| 구분 | 점검항목 | 점검일자 | 점검결과 | 점검인원 |
|--------|--|------------|------|------|
| 연구실 관리 | 안전기준 안전관리에 대한 충분한 이해를 갖춘 상태로 근무하고 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 연구실내 화재경보기 및 소화기 등 안전시설이 작동하고 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 안전기준 안전관리 교육 이수 여부를 확인하고 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 안전기준 내 안전수칙이 게시되어 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 교육내용에 대한 이해도를 위한 별도의 시험이 실시되어 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 실험실 내 소화기, 방화차 등 안전시설이 작동하고 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 실험실 내 안전수칙이 게시되어 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |

연구실 월별 안전점검표

| 구분 | 점검항목 | 점검일자 | 점검결과 | 점검인원 |
|--------|--|------------|------|------|
| 연구실 관리 | 안전기준 안전관리에 대한 충분한 이해를 갖춘 상태로 근무하고 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 연구실내 화재경보기 및 소화기 등 안전시설이 작동하고 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 안전기준 안전관리 교육 이수 여부를 확인하고 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 안전기준 내 안전수칙이 게시되어 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 교육내용에 대한 이해도를 위한 별도의 시험이 실시되어 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 실험실 내 소화기, 방화차 등 안전시설이 작동하고 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 실험실 내 안전수칙이 게시되어 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |
| | 실험실 내 안전수칙이 숙지되어 있는가? | 2016. 7. 1 | ○ | 이동연 |

다. 연구실 안전교육

- 위험등급 A, B등급 연구실에 근무하는 대학원 및 연구원들은 학기당 6시간, 연간 12시간 연구실 안전관리에 관한 사항, 물질보건 안전자료에 관한 사항 등을 포함한 연구실 안전교육을 이수하여 수료증을 연구실 앞에 게시하고 있음.



<제3세부기관(협동) : 경기대학교 산학협력단>

1. 연구실 안전 점검 체계 및 실시

가. 실험실 안전 점검 체계

- 위험등급별로 환경안전점검을 단계별로 체계화하여 관리
- 관리위험등급의 지정
 - A등급 : 가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
 - B등급 : 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생실험(본 과제 실험실)
 - C등급 : 이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

나. 실험실 정밀안전진단 실시

- 대상 : 연구개발활동에 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실
- 실시 : 2년마다 1회 실시하여 교육과학기술부에 보고

다. 교육 훈련

- 개요 : 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이공계 열 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강

- 교육대상 : 교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등

○ 단계별 교육 이수과정 :

- 1단계 : 공통이수과목(등록실험실전체)
- 2단계 : 특수실험실

○ 교육구분

- 정기교육 : 방학기간 중 2회 출석 수업 실시

- 비정기 임시교육 :
 - o 대상 : 새로운 실험과정의 신설시, 연구소의 신설시, 교육 미 이수자(신입 대학원생, 전담직원, 연구원, 업체직원, 유해물질 취급자 등)
 - o 방법 : 사이버 교육 환경안전교육 등(홈페이지 개설 동영상교육), 자료/유인물, 외부 온라인상, 외부강사, 전문교육기관의뢰 등
- 특별교육: 해당기관에서 자체 또는 외부의 전문기관에 의뢰하여 위탁교육 실시

3. 추가 이행 계획

| | |
|-----------------------------|---|
| 1) 실험종사자 건강검진 및 보험 추가가입 | 1. 건강검진(특수실험실) (계획 중) 2. 상해보험추가가입검토(특수실험실) (계획 중) |
| 2) 실험실 공기질 관리, 환기 | 유해물질농도 측정관리, 환기대책수립(계획 중) |
| 3) 실험실 환경개선공사 | 노후 실험실 개선공사 시행(대학에 개선 건의) |
| 4) 특수위험 실험실에 별도의 소화설비 설치 | 위험성이 큰 실험실에 별도의 특수소화 설비를 설치하여 사고 확산을 예방(완료) |
| 5) 유기용매 보관시설 설치 및 액체질소 통합관리 | 1. 보관창고를 설치 통합관리(대체 cabinet 설치) 2. 액체질소를 시약센터에서 통합관리 |
| 6) 실험실 환경안전지침 작성 | 보완작성(완료) |
| 7) 고압가스 안전관리 | 안전시설 설치(완료) |
| 8) 안전보호장비 시설 보완 | 안전보호장비와 안전표지 설치(완료) |

제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

| 번호 | 구분 (논문 /특허 /기타) | 논문명/특허명 /기타 | 소속 기관명 | 역할 | 논문게재지/ 특허등록국가 | 코드번호 | | 사사여부 (단독사사 또는 중복사사) | 특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등) |
|----|--------------------------|--|-----------|---------------|--|------------------|-----------------|------------------------------|-------------------------------|
| | | | | | | Impact Factor | 논문게재일 /특허등록일 | | |
| 1 | 논문 | Rhamnogalacturona n-I-Type Polysaccharide Purified from Broccoli Exerts Anti-metastatic Activities via Innate Immune Cell Activation | 경기 대학교 | 제1저자, 교신저자 | Plant Foods for Human Nutrition | 2.368 | 심사중 | 중복사사 | SCI |
| 2 | 논문 | 브로콜리로부터 분리한 추출물의 in vitro 면역증진 활성평가 및 화학적 특성 | 경기 대학교 | 제1저자, 교신저자 | 한국식품 영양학회 | - | 2017.8.30 | 중복사사 | 국내 |
| 3 | 논문 | Effects of jet-milled defatted soy flour on the physicochemical and sensorial properties of tofu | 중앙 대학교 | 교신 | Food and Bioproducts Processing | 1.970 | 심사중 | 중복사사 | SCI |
| 4 | 논문 | Effects of pulsed electric treatment on the cell membrane permeabilization of white radish | 중앙 대학교 | 교신 | Food Chemistry | 4.529 | 심사중 | 중복사사 | SCI |
| 5 | 학술 발표 | Immunostimulating activities of ethanol and hot water extract, and crude polysaccharide fraction isolated from brussels sprout | 경기 대학교 | | 한국식품 과학회 | | 2015. 06 | | 국내 |
| 6 | 학술 발표 | Ethanol and hot water extract and cude | 경기 대학교 | | 한국식품 과학회 | | 2015. 06 | | 국내 |

| | | | | | | | | | |
|----|-------|--|-------|--|-----------|--|----------|--|----|
| | | polysaccharide fractions isolated from red cabbage induce immunostimulating activities | | | | | | | |
| 7 | 학술 발표 | Immunomodulating activities of ethanol extract, hot water extract and crude polysaccharide fraction isolated from broccoli | 경기대학교 | | 한국식품영양과학회 | | 2015.08 | | 국내 |
| 8 | 학술 발표 | Cytotoxicity and Immuno-stimulating Activities of Ethanol Extract, Hot Water Extract and Crude Polysaccharide from Korean Radishes | 경기대학교 | | 한국식품영양과학회 | | 2015.08 | | 국내 |
| 9 | 학술 발표 | A crude polysaccharide from broccoli activates macrophages via MAPK and NF- κ B signaling pathway | 경기대학교 | | 한국식품과학회 | | 2016.08 | | 국내 |
| 10 | 학술 발표 | Inhibitory effect of crude polysaccharide isolated from broccoli on tumor metastasis | 경기대학교 | | 한국식품과학회 | | 2016. 08 | | 국내 |
| 11 | 학술 발표 | Chemical properties and immunostimulating activity of the polysaccharide purified from the pectinase digests | 경기대학교 | | 한국식품영양과학회 | | 2016.11 | | 국내 |

| | | | | | | | | | |
|----|-------|---|----------------|--|-----------|--|-----------------|--|----|
| | | of broccoli | | | | | | | |
| 12 | 학술 발표 | Anti-Metastatic and Immunostimulating Activities of a Crude Polysaccharide Isolated from Red Cabbage | 경기대학교 | | 한국식품영양과학회 | | 2016.11 | | 국내 |
| 13 | 학술 발표 | Effect of intravenous and oral administration of the pectic polysaccharide purified from broccoli on NK-cell and tumor metastasis | 경기대학교 | | 한국식품영양과학회 | | 2016. 11 | | 국내 |
| 14 | 학술 발표 | Structural Characteristics of Anti-Metastatic Rhamnogalacturonan I Purified from Broccoli | 경기대학교 | | 한국식품과학회 | | 2017.07 | | 국내 |
| 15 | 학술 발표 | Structural Characterization of Immuno-Stimulating Polysaccharide from Broccoli | 경기대학교 | | 日本糖質學會 | | 2017.07 | | 일본 |
| 16 | 특허 등록 | 설포라판 함량이 증가된 브로콜리의 제조방법 및 그로부터 제조된 브로콜리의 이용 | (주)비케이 바이오 | | | | | | |
| 17 | 특허 등록 | 면역 증강 활성 및 항암 활성이 있는 브로콜리 유래 다당 분획물 및 이의 제조방법 | (주)비케이 바이오 경기대 | | | | 10-2017-0098048 | | 국내 |
| 18 | 특허 등록 | 면역 증강 활성 및 항암 활성이 있는 적양배추 유래 다당체 및 이의 제조방법 | (주)비케이 바이오 경기대 | | | | 10-2017-0098049 | | 국내 |
| 19 | 특허 | 설포라판 함량이 | (주)비케이 | | | | 15303779 | | 미국 |

| | | | | | | | | | |
|----|----------|---|---------------|--|--|--|--------------------|--|----|
| | 등록 | 증가된 브로콜리의 제조방법 및 그로부터 제조된 브로콜리의 이용 | 바이오 | | | | | | |
| 20 | 특허 등록 | 설포라판 함량이 증가된 브로콜리의 제조방법 및 그로부터 제조된 브로콜리의 이용 | (주)비케이 바이오 | | | | 2015800008 51.9 | | 중국 |
| 21 | 특허 등록 | 설포라판 함량이 증가된 브로콜리의 제조방법 및 그로부터 제조된 브로콜리의 이용 | (주)비케이 바이오 | | | | 2016-56291 7 | | 일본 |
| 22 | 특허 등록 | 설포라판 함량이 증가된 브로콜리의 제조방법 및 그로부터 제조된 브로콜리의 이용 | (주)비케이 바이오 | | | | 15779259.9 | | 유럽 |

제 11 장 기타사항

| | |
|-------------------------------|------|
| | D-13 |
| <input type="radio"/> 해당사항 없음 | |

제 12 장 참고문헌

D-14

- 염선민, 최영진. "식품 제조 과정 중 이산화탄소 발생량 정량을 위한 전과정평가법의 활용." *Safe Food* 6.3 (2011): 17-23.
- 윤성이, 권혁준. "전과정평과를 통한 유기농자재의 탄소배출량 산정연구." *한국유기농업학회지* 19.1 (2011): 23-38.
- Lee, Jae-Hoon, et al. "Quality characteristics of sponge cake added with mesangi (*Capsosiphon fulvescens*) powder." *Korean journal of food and cookery science* 23.1 (2007): 83-89.
- Guerin, E., et al. "Rheological characterization of pharmaceutical powders using tap testing, shear cell and mercury porosimeter." *International journal of pharmaceutics* 189.1 (1999): 91-103.
- Robertson, James A., et al. "Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: a European collaborative study." *LWT-Food Science and Technology* 33.2 (2000): 72-79.
- Zhang, Zipei, et al. "Characterization of stipe and cap powders of mushroom (*Lentinus edodes*) prepared by different grinding methods." *Journal of Food Engineering* 109.3 (2012): 406-413.
- Muttakin, Syahrizal, Min Soo Kim, and Dong-Un Lee. "Tailoring physicochemical and sensorial properties of defatted soybean flour using jet-milling technology." *Food chemistry* 187 (2015): 106-111.
- 송주화, 윤연옥 (2015) 2014년 사망원인통계. 대전: 통계청, pp.1-5.
- Sawyers C (2004) Targeted cancer therapy. Nature, 432: 294-297
- Leber MF, Efferth T (2009) Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). Int. J. Oncol., 34: 881.
- Valastyan S, Weinberg RA (2011) Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. Cell, 147: 275-292.
- Chari RV (2007) Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. Accounts Chem. Res., 41: 98-107.
- Schuster M, Nechansky A, Kircheis R (2006) Cancer immunotherapy. Biotechnology journal, 1: 138-147
- Kuby J (2006) Immunology (5th edition). New York: Worldscience, pp.9-19, 32-39, 46-50, 55-75, 315-337.
- Playfair JHL (1992) Natural and adaptive immune mechanisms. In Immunology at a Glance. London: Blackwell Scientific Publications.

- Lee CK, Gray GR (1988) A general strategy for the chemical sequencing of polysaccharides. J. Am. Chem. Soc., 110: 1292.
- Cebra JJ, Shroff KE (1994) Peyer's patches as inductive sites for IgA commitment. In Handbook of Mucosal Immunology. New York: Academic press, pp.151-158.
- James SP, Zeitz M (1994) Human gastrointestinal Mucosal T cells. In Handbook of Mucosal Immunology. New York: Academic press, pp.275-285.
- Oh MY (2005) Infection and innate immunity. Korean J. Pediatr., 48: 1153-1161.
- Takasugi M, Mickey MR, Terasaki PI (1973) Reactivity of lymphocytes from normal person on cultured tumor cells. Cancer Res., 33: 2808.
- Schmidt R, Acarkan A, Boivin K (2001) Comparative structural genomics in the Brassicaceae family. Plant Physiol. Bioch., 39: 253-262.
- Franzke A, Lysak MA, Al-Shehbaz IA, Koch MA, Mummenhoff K (2011) Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae. Trends Plant Sci., 16: 108-116.
- Ravikumar C (2015) Therapeutic potential of Brassica oleracea (broccoli) - A review. Int. J. Drug Dev. & Res., 7: 9-10.
- Lee S, Rhee S (1997) Inhibitory effect of various Cruciferous vegetables on the growth of human cancer cells. Korean J. Life Science, 7: 234-240.
- Gamet-Payraastre L, Li P, Lumeau S, Cassar G, Dupont MA, Chevolleau S, Gasc N, Tulliez J, Tercé F (2000) Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. Cancer Res., 60: 1426-1433.
- Shim KH, Sung NK, Kang KS, Ahn CW, Seo KI (1992) Analysis of glucosinolates and the change of contents during processing and storage in cruciferous vegetables. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 21: 43-48.
- Maxwell EG, Belshaw NJ, Waldron KW, Morris VJ (2012) Pectin - an emerging new bioactive food polysaccharide. Trends Food Sci. Tech., 24: 64-73.
- Shin KS, Kiyohara H, Matsumoto T (1998) Rhamnogalacturonan II dimers cross-linked by borate diesters from the leaves of Panax ginseng C.A. Meyer are responsible for expression of their IL-6 production enhancing activities. Carbohydr. Res., 307: 97-106.
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Song SK, Lee KB, Her E, Song KS, Kim JB (2003) Antitumor activity of the Korean mistletoe lectin is attributed to activation of macrophages and NK cells. Arch. Pharm. Res. 26: 861-7
- Mueller EA, Anderer FA (1990) Synergistic action of a plant rhamno- galacturonan enhancing antitumor cytotoxicity of human natural killer and lymphokine-activated killer cells: chemical specificity of target cell recognition. Cancer Res., 50: 3646-3651.
- 오세량, 정근영, 이형규 (1996) 천연유래의 항보체 활성물질 선발을 위한 미량탐색법. 한국농화학회지, 39: 147-152.
- Janaeway CA (2001) Immunobiology, New York: Garland science pp.107-131.
- Mercken M, Vandermeeren M, Lubke U, Six J, Boons J, Vanmechelen E, Van de Voorde A,

- Gheuens J (1992) Affinity purification of human tau proteins and the construction of a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human tau detection. J. Neurochem., 58: 548 - 553.
- Griess P (1879) Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen”. Ber. Dtsch. Chem. Ges., 12: 426-428.
- Tsukagoshi S, Hashimoto Y, Fujii G, Kobayashi H, Nomoto K, Orita K (1984) Krestin (PSK). Cancer Treat. Rev., 11: 131-155.
- Mueller EA, Anderer FA (1990) Chemical specificity of effector cell/tumor cell bridging by a *Viscum album rhamnogalacturonan* enhancing cytotoxicity of human NK cells. J. Immunopharm., 19: 69-77.
- Yoon TJ, Yoo YC, Lee SW, Shin KS, Choi WH, Hwang SH, Ha ES, Jo SK, Kim SH, Park WM (2004) Anti-metastatic activity of *Acanthpanax senticosus* extract and its possible immunological mechanism of action. J. Ethnopharm., 93: 247-253.
- Zitvogel L, Robbins PD, Storkus WJ, Clarke MR, Maeurer MJ, Campbell RL, Geoffery DC, Tahara H, Schreiber RD, Lotze M (1996) IL-12 and B7.1 co-stimulation cooperate in the induction of effective antitumor immunity and therapy of established tumor. Eur. J. Immunol., 26: 1336-1341.
- 이수정 (2015) 전분 가공 부산물에서 분리한 다당의 면역활성, 구조 및 작용양식. 수원: 경기대학교 대학원, pp.18.
- Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1951) A colorimetric method for the determination of sugars. Nature, 168: 167.
- Blumenkrantz N, AsboeHansen G (1973) New method for quantitative determination of uronic acid. Anal. Biochem., 54: 484-489.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyebinding. Anal. Biochem., 72: 248-254.
- Yamada H, Kiyohara H, Cyong JC, Kojima Y, Kumazawa Y, Otsuka Y (1984) Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*. Part 1. Fractionation and biological properties of polysaccharide. Planta. Med., 50: 163-167.
- Singleton V, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Viticult., 16: 144-158.
- Jones TM, Albersheim P (1972) A gas chromatographic method for the determination of aldose
- Van Holst GJ, Clarke AE (1985) Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. Anal. Biochem., 148: 446-450.

- Hakomori SA (1964) A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfonium carbanion in dimethyl sulfoxide. J. Biochem., 55: 205-208.
- Björkman M, Klingen I, Birch AN, Bones AM, Bruce TJ, Johansen TJ, Meadow R, Molmann J, Seljasen R, Smart LE, Stewart D (2011) Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health - Influences of climate, environment and agronomic practice. Phytochemistry, 72: 538-556.
- Herr I, Büchler MW (2010) Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: implications for prevention and therapy of cancer. Cancer Treat. Rev., 36: 377-383.
- 신광순 (2012) 식물 기원의 면역활성 다당. 식품과학과 산업, 45: 12-22.
- Unanue ER (1984) Antigen-presenting function of the macrophage. Annu. Rev. Physiol., 2: 395-428.
- Wang H, Actor JK, Indrigo J, Olsen M, Dasgupta A (2003) Asian and Siberian ginseng as a potential modulator of immune function: An in vitro cytokine study using mouse macrophages. Clin. chim. Acta., 327: 123-128.
- Meyer RA (2007) Immunology; From Cell Biology to Disease. Berlin: Wiley-VCH, pp.102-107.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2014) Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, pp.2-5.
- Elenkov IJ, Chrousos GP (1999) Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. Trends Endocrin. Met., 10: 359-368.
- Bradding P, Feather IH, Howarth PH, Mueller R, Roberts JA, Britten K, Bwes JP, Hunt CT, Okayama Y, Heusser CH (1992) Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. J. Exp. Med., 176: 1381-1386.
- Funk J, Schmitz G, Bach U (2003) Influence of different tumour types on natural cytotoxicity (NK cell activity) and mitogen-induced lymphocyte proliferation in isolated blood lymphocytes from 110 dogs with tumours. Res. Vet. Sci., 74: 129-135.
- Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA (2002) Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. Blood, 100: 1935-1947.
- Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, Van Dommelen SLH, Degil-Esposti MA, Hayakawa Y (2005) Activation of NK cell cytotoxicity. Mol. Immunol., 42: 501-510.
- Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM
- Hengartner H (1994) Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. Nature, 368: 31-37.
- Kasai M, Yoneda T, Habu S, Maruyama Y, Okumura K, Tokunaga T (1981) In vivo effect of

anti-asialo GM1 antibody on natural killer activity. Nature, 291: 334-335.

- Shin JW, Seol IC, Son CG (2010) Interpretation of animal dose and human equivalent dose for drug development. J. Korean Orient Med., 31: 1-7.
- Yang SH, Andrew DS, Alan JW (2003) Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. Gene, 320: 3-21.
- Lewis TS, Paul SS, Natalie GA (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. Adv. cancer res. 74: 49-114.
- Kyriakis JM, Joseph A (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. Physio. rev., 81: 807-869.
- Liacini A, Sylvester J, Li WQ., Zafarullah M (2002). Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. Matrix Biol., 21: 251-262.
- Rosette C, Michael K (1996) Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. Science, 274: 1194-1197.
- Vabulas RM., Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Häcker H, Wagner H (2001) Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. J. Biol. Chem., 276: 31332-31339.
- Doco T, O'Neill M, Pellerin P (2001) Determination of the neutral and acidic glycosyl-residue compositions of plant polysaccharides by GC-EI-MS analysis of the trimethylsilyl methyl glycoside derivatives. Carbohydr. Polym., 46: 249-259.
- Clarke AE, Anderson RL, Stone BA (1979) Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. Phytochemistry, 18: 521-540.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

| | | | | | |
|---------------------------|--|--------------|----------------------------|---------------------------|----|
| 과 제 명 | (국문) 친환경 녹색기술인 펄스전기장을 활용한 면역증강 기능의 고부가 십자화과 농산가공품 개발 및 산업화 | | | | |
| | (영문) Development of value-added immuno-stimulating food and materials from <i>Brassicaceae</i> using PEF eco-friendly technology | | | | |
| 주관연구기관 | (주)비케이바이오 | | 주 관 연 구 자 | (소속) (주)비케이바이오 | |
| 참 여 기 업 | 경기대학교 산학협력단 중앙대학교 산학협력단 어랑진 영농조합법인 | | 책 임 자 | (성명) 최혁준 | |
| 총연구개발비 (900,000천원) | 계 | 900,000,000원 | 총 연구 기간 | 2014.8.1~2017.7.31(3년 월) | |
| | 정부출연 연구개발비 | 675,000,000원 | 총 참 연 구 원 수 | 총 인원 | 20 |
| | 기업부담금 | 225,000,000원 | | 내부인원 | 20 |
| | 연구기관부담금 | 0원 | | 외부인원 | 0 |

- 연구개발 목표 및 성과
- 연구개발 목표 : 친환경 녹색기술인 펄스전기장 기술을 활용하여 십자화과(브로콜리, 양배추, 적양배추, 콜리플라워, 순무, 무)의 면역증강 물질 함량을 증가시키는 기술을 개발하고, 개발된 기술을 활용하여 기능성 농산물 및 소재를 개발하고 이를 산업화하는데 있음
 - 연구개발 성과 :
면역증강 물질 sulforaphane 이 증폭된 농산물 1종 이상 개발 (슈퍼콜리)
Sulforaphane이 증폭된 농산물을 활용한 분말 및 액기스 소재 3종 이상 개발
분말, 액기스 및 퓨레 제품의 품질 규격 가이드 설정 확립함.
농산가공 소재의 산업화를 위한 포장 및 저장법 개발함
- 연구내용 및 결과
- 펄스전기장 이용하여 설포라판의 증폭을 위한 최적 공정 확립
 - 설포라판 등 기능성 대사체 분석 및 최적화
 - 획득된 기능성 다당 분획의 면역활성 및 종양전이 억제활성 지표물질 선정 및 효능 기전 규명함.
 - 획득된 다당의 화학적 조성, 구성당, 및 분자량을 통해 구조적 특성 규명함.
 - 면역 증강 물질 설포라판이 증폭된 농산물 1종 개발함(슈퍼콜리)
 - 개발된 소재 및 제품의 품질 규격 가이드 설정 확립
 - 기능성 성분의 산업화 및 응용제품 개발함.
- 연구성과 활용실적 및 계획
- 본 과제를 통해 개발된 브로콜리 유래 다당체 소재 및 설포라판 소재에 대한 생산공정 확립을 완료하였으며, 이들 제품은 주관기업의 자체 생산설비를 활용하여 제품화를 계획하고 있음.
 - 제품화 초기, 개발 소재들은 일반음료 및 기능성음료 등 소비자 접근이 쉬운 제품에 우선 적용함으로써 제품 인지도를 높여나갈 계획임.
 - 본 연구개발과제의 종료 후에도 개발된 소재들에 대한 유효성, 안정성, 지표물질, 표준화 등 개별인정 취득을 위한 충실한 자료 확보 계획임.
 - 이와 관련하여 당사에서는 “설포라판 함량이 증가된 브로콜리의 제조방법 및 그로부터 제조된 브로콜리의 이용” 지적 재산을 활용하여 기술실시할 계획. 해당 기술은 개별인정형 건강기능식품 신청을 위한 근거자료 및 제품 생산을 위한 기반자료로 활용 할 계획임.

자체평가의견서

1.

| | | | | | |
|---------------------|---|-------------------------|-----------|---------|---------|
| | | | D-15 | | |
| 과제번호 | | | 114029-03 | | |
| 사업구분 | 고부가가치식품기술사업 | | | | |
| 연구분야 | 기능성식품 | | 과제구분 | 단위 | |
| 사업명 | 고부가가치식품기술사업 | | | 주관 | |
| 총괄과제 | 기재하지 않음 | | 총괄책임자 | 기재하지 않음 | |
| 과제명 | 친환경 녹색기술인 펄스전기장을 활용한 면역증강 기능의 고부가 십자화과 농산가공품 개발 및 산업화 | | 과제유형 | (개발) | |
| 연구기관 | (주)비케이바이오 | | 연구책임자 | 최혁준 | |
| 연구기간 연구비 (천원) | 연차 | 기간 | 정부 | 민간 | 계 |
| | 1차년도 | 2014.8.1.~ 2015.7.31 | 225,000 | 75,000 | 300,000 |
| | 2차년도 | 2014.8.1.~ 2015.7.31 | 225,000 | 75,000 | 300,000 |
| | 3차년도 | 2014.8.1.~ 2015.7.31 | 225,000 | 75,000 | 300,000 |
| | 계 | | 675,000 | 225,000 | 900,000 |
| 참여기업 | (주)비케이바이오, 어량진영농조합법인 | | | | |
| 상대국 | | 상대국연구기관 | | | |

2. 평가일 :

3. 평가자(연구책임자) :

| | | |
|-----------|------|-----|
| 소속 | 직위 | 성명 |
| (주)비케이바이오 | 대표이사 | 최혁준 |

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

| | |
|-----|--|
| 확 약 | |
|-----|--|

I. 연구개발실적

다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

- 세계 최초로 펄스전기장 처리한 십자화과 식물 중 브로콜리 기능성 소재인 sulforaphane 함량이 증가한 브로콜리를 개발에 성공하였고, 이를 “슈퍼콜리”라 명명하였음.
- 브로콜리로부터 추출한 다당체의 구조적 특성을 밝혔고, 브로콜리 유래 다당이 우수한 면역활성 및 종양전이 억제활성이 있음을 동물시험과 세포 시험을 통해 확인하였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

- 펄스전기장 처리 브로콜리와 브로콜리 유래 다당을 활용한 건강기능식품 개발로 농가소득 증대, 브로콜리산업 활성화, 지역 경제 활성화에 기여할 것으로 예상됨.
- 새로운 기술과 함께 기업도약의 기틀 구축하고 매출 증가로 기업의 수익구조 개선 및 신제품에 대한 선점적 위치확보 효과가 있음.
- 기타 건강기능성 식품과의 연계 및 파생상품의 개발을 가능하게 함.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

- Sulforaphane 함량이 증가된 슈퍼콜리와 브로콜리 유래 다당을 이용한 기능성 식품 소재, 의약품 소재, 향장품 소재로 활용 가능성이 매우 높음.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

- 연구개발 기간동안 협동기관들과 유기적 관계를 유지하며 정기 및 상시 연구 미팅을 가졌으며, 주관기관 주도하에 주기적으로 연구진도 점검을 실시하였음. 펄스전기장 처리 브로콜리와 브로콜리 유래 다당에 대한 유효성, 안정성, 지표물질, 표준화 등 건강기능성 식품 개발을 위한 충실한 자료 준비함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수)

- 본 과제를 통하여 현재 국내 특허 등록 1건, 국내 특허출원 2건, 국내 저널지 1편을 등재하였으며, 현재 SCI 2편이 투고 심사 중에 있다. 연구성과 발표는 국외 학술발표 1건, 국내 학술발표 10건 발표하였다. 현재 작성 중인 SCI 논문 1편은 2017년 내에 투고될 예정이다.

II. 연구목표 달성도

| 세부연구목표 (연구계획서상의 목표) | 비중 (%) | 달성도 (%) | 자체평가 |
|--|-----------|------------|---|
| ① 면역증강 성분의 분석법을 확립하여 제품 표준화 및 규격 설정을 위한 표준을 마련 | 5 | 100 | ○ UPLC-MS/MS를 활용하여 전구체인 glucoraphanin과 sulforaphane의 동시 분석 방법을 확립함. |
| ② 원료 및 성과물에 대한 물리, 화학적 평가를 통해 최적의 원료를 선정하고, 생산 공정을 최적화 | 5 | 100 | ○ 물리, 화학적 특성을 조사한 결과 십자화과 전체 품종의 sulforaphane 함량 분석 결과 브로콜리와 적양배추에서 높게 나타남으로 브로콜리를 최적의 원료로 선정하고 공정을 최적화함. |
| ③ 시생산을 통한 품질 검증 및 산업화를 위한 제품 개발 | 10 | 100 | ○ 제품의 물리적, 화학적, 미생물학적 규격 설정 및 품질 규격 가이드 제시, 최적의 공정 검증 및 제품의 관능, 품질, 가공적성, 포장 및 저장법 제시 |
| ④ 제주산 십자화가 식물들의 품종 및 재배 정보를 수집하여 제시 | 5 | 100 | ○ 십자화과 식물의 재배면적, 과중시기, 수확시기, 재배시 생육적온, 수확 후 보관 등 재배환경 조사하여 제시 |
| ⑤ 설포라판 생성이 우수하며, 가공품 개발 및 원활한 수급이 가능한 품종을 선택하여 후보 품종을 제시 | 5 | 100 | ○ 십자화과 식물 중 sulforaphane 함량이 가장 많은 브로콜리와 적양배추를 후보 품종으로 선정 |
| ⑥ 선정된 품종의 효율적이고 경제적인 수급 체계를 제시 | 5 | 100 | ○ 선정된 품종의 재배, 수급방법, 공급의 제공법 확립 |
| ⑦ 시생산을 위한 선정 원료 제공 및 산업화를 위한 재배를 추진 | 5 | 100 | ○ 안정적인 원료 제공 받기 위해 브로콜리 재배농가와 계약재배추진 |
| ⑧ 설포라판 전환효소의 kinetics 연구를 통해 PEF와의 상관성을 확인 | 5 | 100 | ○ 십자화과 모델 식물로 무와 브로콜리를 대상으로 펄스처리 후 세포막 붕괴도는 이온용출, Impedance 측정, 세포막 염색법 등을 통해 정량 및 정성적 측정을 통해 상관성을 확인함. ○ Myrosinase 활성 측정은 Sinigrin-Go kit 법으로 측정을 통해 상관성을 확인함. |
| ⑨ PEF처리 후 물리적 품질 평가법을 확립하고, 결과물에 대한 제품 표준화 기준을 제시 | 5 | 100 | ○ 물성, 가공적 특성 평가법 기준 확립 ○ 생산 공정 및 제품 규격화 기준 확립 |
| ⑩ 원료별 PEF 최적 처리 조건을 확립하고 우수 원료를 제시 | 5 | 100 | ○ 무, 브로콜리 등 십자화과 식물에 대한 설포라판 등 기능성 대사체 분석 및 최적화 ○ 대사체 추출법 및 LC-MS 기반 대사체 분석법 확립 |

| | | | |
|--|---|-----|--|
| | | | ○ 가공 처리에 따른 브로콜리 함유 활성 대사체 분석 및 다변량 통계분석을 통한 대사체 변이 분석. |
| ⑪ PEF chamber 공정 디자인을 개발하여 최적화 공정 가이드 제시 | 5 | 100 | ○ - 연속형 펄스처리조 설계 및 제작 ○ 십자화과 식물의 연속형 펄스처리 적용 및 최적화 조건 적용 |
| ⑫ PEF chamber 공정 디자인을 개발하여 에너지 절감의 최적화 공정 가이드 제시 | 5 | 100 | ○ PEF 연속공정 적용 및 기능성분 대사체 분석 ○ 연속형 PEF 처리의 에너지 효율 분석 |
| ⑬ 산업화 PEF chamber 공정의 검증을 통한 공정 재현성을 평가 | 5 | 100 | ○ 기능성이 증폭된 브로콜리의 초미세 분말화 ○ 초미세브로콜리분말의 식품가공적성 |
| ⑪ PEF chamber 공정 디자인을 개발하여 최적화 공정 가이드 제시 | 5 | 100 | ○ 연속형 펄스처리조 설계 및 제작 ○ 십자화과 식물의 연속형 펄스처리 적용 및 최적화 조건 적용 |
| ⑫ PEF chamber 공정 디자인을 개발하여 에너지 절감의 최적화 공정 가이드 제시 | 5 | 100 | ○ PEF 연속공정 적용 및 기능성분 대사체 분석 ○ 연속형 PEF 처리의 에너지 효율 분석 |
| ⑬ 산업화 PEF chamber 공정의 검증을 통한 공정 재현성을 평가 | 5 | 100 | ○ 기능성이 증폭된 브로콜리의 초미세 분말화 ○ 초미세브로콜리분말의 식품가공적성 |
| ⑭ 원재료와 PEF 처리된 십자화과 식물의 면역 및 항암활성 비교 평가 | 5 | 100 | ○ 브로콜리, 적양배추, 무, 방울다다기 양배추 총 4종의 십자화과 식물 추출물에 대하여 cytokine 생산능을 조사 한 결과 적양배추, 브로콜리, 방울양배추, 무 순으로 나타남. |
| ⑮ 원재료와 PEF 처리된 십자화과 식물의 면역활성 비교에 의한 고효율성 식물 선별 | 5 | 100 | ○ <i>In vitro</i> 상에서 면역활성을 측정한 결과, 수율과 활성을 고려하였을 때 브로콜리가 가장 우수하다고 확인되어 면역활성 십자화과 식물 선별 |
| ⑯ PEF 처리 십자화과 식물에 의한 <i>in vivo</i> 면역 및 항암활성 평가 | 5 | 100 | ○ 정맥투여를 통한 브로콜리 다당에 의해 NK cell 활성이 농도 의존적으로 증가함을 확인하였고, 항전이 활성은 1,000 μ g/mouse의 농도에서 약 20%의 종양전이 억제활성을 확인함. |
| ⑰ PEF 처리 십자화과 식물 유래 면역활성 성분의 작용 양식 해명 | 5 | 100 | ○ 브로콜리 다당은 면역활성 cytokine IL-6는 주로 SR을 통해 NF κ B경로를 경유하여 생산하며, NO의 생산에는 TLR4, dectin1 및 SR을 통해 JNK, p38, NF κ B의 경로를 경유함을 확인함 |
| ⑱ 가공제품으로부터 활성성분의 분 | 5 | 100 | ○ 브로콜리 유래 정제 다당 BCE-I의 미세 |

| | | | |
|-------------------------------|------|-----|--|
| 리, 함량 결정 및 지표물질의 선정 | | | 구조를 규명하기 위해 연속적인 효소처리로 단편획분 BCE-I-1a, 1b와 BCE-I-2a, 2b, 2c를 정제하고 이를 methylation analysis, 구성당 분석, β -glycosyl Yariv reagent와의 반응성, Q-TOF 및 LC-MS를 이용한 서열 분석을 진행한 결과 면역활성 및 항전이 활성에 주로 공헌하는 arabino- β -3,6-galactan을 가진 rhamnogalacturonan I의 구조임이 확인함 |
| ⑩ 면역 및 항암 활성성분의 구조, 화학적 특성 규명 | 5 | 100 | ○ 브로콜리 식물체에서 높은 면역 및 항전이 활성을 보인 BCE-I은 1,3-galactan을 중심으로 1,6-galactan이 고도로 분지된 type II arabino- β -3,6-galactan의 구조를 밝힘 |
| 합계 | 100점 | | |

III. 종합의견

1. 대한 종합의견

- 본 과제를 통해 펄스전기장 처리한 브로콜리의 sulforaphane 함량이 증가된 “슈퍼콜리”를 개발함.
- 면역활성 및 종양전이 억제활성이 우수한 브로콜리 유래 면역다당 소재를 개발함
- 소재화를 위한 추출 공정 및 가공 공정의 표준화 및 지표 성분 물질의 표준화 완료하였음
- 제품화를 위해 분말, 액기스, 푸레 시제품을 개발하였고, 슈퍼콜리 분말을 이용하여 두부와 스펀지 케
- 익을 개발함.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 최초 목표로 하였던 2건의 SCI 학술 논문과 2건 비SCI 학술 논문, 4건 학술발표, 1건 지적 재산권을 초과 달성하여 3건의 SCI 학술논문과 13건의 학술발표 및 3건의 지적 재산권을 달성함.
- 제품 개발을 통해 지역 경제 활성화에 기여하며 연구목표 계획을 초과하는 100%의 연구 목표를 달성함.
- 또한 본 연구과제의 성과를 통해 농가로부터 국내 브로콜리 생산을 촉진하고 이를 통해 농가 소득 증대에 기여할 수 있다고 생각되며 성공적인 과제 수행으로 판단됨.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

○ 펄스전기장 처리 브로콜리의 sulforaphane과 면역다당을 활용한 개별인정형 건강기능식품 개발, 의약품 소재, 기능성화장품 소재 확보가 가능함.

IV. 보안성 검토

○ 해당사항 없음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

| | | | | |
|--------|--|-------------|---------|-------------|
| 사업추진형태 | <input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제 | 분 야 | 기능성 식품 | |
| 연구과제명 | 친환경 녹색기술인 펄스전기장을 활용한 면역증강 기능의 고부가 십자화과 농산가공품 개발 및 산업화 | | | |
| 주관연구기관 | (주) 비케이바이오 | 주관연구책임자 | 최혁준 | |
| 연구개발비 | 정부출연 연구개발비 | 기업부담금 | 연구기관부담금 | 총연구개발비 |
| | 675,000,000 | 225,000,000 | - | 900,000,000 |
| 연구개발기간 | 2014.8.1 ~ 2017.7.31 (3년) | | | |
| 주요활용유형 | <input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:) | | | |

2. 연구목표 대비 결과

| 당초목표 | 당초연구목표 대비 연구결과 |
|--|---|
| ① 면역증강 성분의 분석법을 확립하여 제품 표준화 및 규격 설정을 위한 표준을 마련 | ○ UPLC-MS/MS를 활용하여 친구체인 glucoraphanin과 sulforaphane의 동시분석 방법을 확립함. |
| ② 원료 및 성과물에 대한 물리, 화학적 평가를 통해 최적의 원료를 선정하고, 생산 공정을 최적화 | ○ T.A측정 결과양배추(547g) > 적양배추(452g) > 순무(357g) > 브로콜리(299g) > 콜리플라워(212g) > 무(176g) 순으로 양배추가 가장 단단하고 무가 가장 연함 ○ 십자화과 전체 품종의 sulforaphane 함량 분석 결과 브로콜리와 적양배추에서 높게 나타남으로 브로콜리를 최적의 원료로 선정함 |
| ③ 시생산을 통한 품질 검증 및 산업화를 위한 제품 개발 | ○ 제품의 물리적, 화학적, 미생물학적 규격 설정 및 품질 규격 가이드 제시, 최적의 공정 검증 및 제품의 관능, 품질, 가공적성, 포장 및 저장법 제시 |
| ④ 제주도 십자화과 식물들의 품종 및 재배 정보를 수집하여 제시. | ○ 십자화과 식물의 재배면적, 파종시기, 수확시기, 재배시 생육적온, 수확 후 보관 등 재배환경 조사하여 제시함. ○ 십자화과 식물의 대부분이 제주지역에서 재배가 가능하나 순무의 경우 아직 제주도에서 재배가 불가하며, 콜리플라워의 경우 재배를 하고 있으나 재배 양이 많지 않음 |
| ⑤ 설포라판 생성이 우수하며, 가공품 개발 및 원활한 수급이 가능한 품종을 선택하여 후보 품종을 제시 | ○ 십자화과 식물 중 sulforaphane 함량이 가장 많은 브로콜리와 적양배추를 후보품종으로 선정함 ○ 어랑진 영농조합법인에서 후보품종인 브로콜리와 적양배추의 재배면적, 파종 및 수확시기, 수확 후 보관방법, 출하 및 유통시 보관방법 등 |

| | |
|---|---|
| | 원료 수급현황 및 제공법 확립에 관한 자료를 조사함 |
| ⑥ 선정된 품종의 효율적이고 경제적인 수급 체계를 제시 | ○ 선정된 품종의 재배, 수급방법. 공급의 제공법 확립 |
| ⑦ 시생산을 위한 선정 원료 제공 및 산업화를 위한 재배를 추진 | ○ 브로콜리 재배농가와 계약재배를 통해 안정적인 원료 제공 받음. |
| ⑧ 설포라판 전환효소의 kinetics 연구를 통해 PEF와의 상관성을 확인 | ○ 십자화과 모델 식물로 무와 브로콜리를 대상으로 펄스처리 후 세포막 붕괴도는 이온용출, Impedance 측정, 세포막 염색법 등을 통해 정량 및 정성적 측정을 통해 상관성을 확인함. ○ Myrosinase 활성 측정은 Sinigrin-Go kit 법으로 측정을 통해 상관성을 확인함. |
| ⑨ PEF처리 후 물리적 품질 평가법을 확립하고, 결과물에 대한 제품 표준화 기준을 제시 | ○ 물성, 가공적 특성 평가법 기준 확립 ○ 생산 공정 및 제품 규격화 기준 확립 |
| ⑩ 원료별 PEF 최적 처리 조건을 확립하고 우수 원료를 제시 | ○ 무, 브로콜리 등 십자화과 식물에 대한 설포라판 등 기능성 대사체 분석 및 최적화 ○ 대사체 추출법 및 LC-MS 기반 대사체 분석법 확립 ○ 가공 처리에 따른 브로콜리 함유 활성 대사체 분석 및 다변량 통계분석을 통한 대사체 변이 분석. |
| ⑪ PEF chamber 공정 디자인을 개발하여 최적화 공정 가이드 제시 | ○ 연속형 펄스처리조 설계 및 제작 ○ 십자화과 식물의 연속형 펄스처리 적용 및 최적화 조건 적용 |
| ⑫ PEF chamber 공정 디자인을 개발하여 에너지 절감의 최적화 공정 가이드 제시 | ○ PEF 연속공정 적용 및 기능성분 대사체분석 ○ 연속형 PEF 처리의 에너지 효율 분석 |
| ⑬ 산업화 PEF chamber 공정의 검증을 통한 공정 재현성을 평가 | ○ 기능성이 증폭된 브로콜리의 초미세 분말화 ○ 초미세브로콜리분말의 식품가공적성 |
| ⑭ 원재료와 PEF 처리된 십자화과 식물의 면역 및 항암활성 비교 평가 | ○ 브로콜리, 적양배추, 무, 방울다다기 양배추 총 4종의 십자화과 식물 추출물에 대하여 cytokine 생산능을 조사 한 결과 적양배추, 브로콜리, 방울양배추, 무 순으로 나타남. |
| ⑮ 원재료와 PEF 처리된 십자화과 식물의 면역 활성 비교에 의한 고효성 식물 선별 | ○ 산업적 이용측면에서 수율, 저 분자획분의 세포독성 및 다당 획분의 면역 활성에서 공통적으로 우수한 브로콜리를 최종 실험 대상 식물체로 선정함. |
| ⑯ PEF 처리 십자화과 식물에 의한 in vivo 면역 및 항암활성 평가 | ○ 정맥투여를 통한 브로콜리 다당에 의해 NK cell 활성이 농도 의존적으로 증가함을 확인하였고, 항전이 활성은 1,000 µg/mouse의 농도에서 약 20%의 종양전이 억제활성을 확인함. |
| ⑰ PEF 처리 십자화과 식물 유래 면역활성 성분의 작용 양식 해명 | ○ 브로콜리 다당은 면역활성 cytokine IL-6는 주로 SR을 통해 NFκB경로를 경유하여 생산하며, NO의 생산에는 TLR4, dectin1 및 SR을 통해 JNK, p38, NFκB의 경로를 경유함을 확인함. |
| ⑱ 가공제품으로부터 활성성분의 분리, 함량 결정 및 지표물질의 선정 | ○ 브로콜리 유래 정제 다당 BCE-I의 미세 구조를 규명하기 위해 연속적인 효소처리로 단편획분 |

| | |
|-------------------------------|---|
| | BCE-I-1a, 1b와 BCE-I-2a, 2b, 2c를 정제하고 이를 methylation analysis, 구성당 분석, β -glycosyl Yariv reagent와의 반응성, Q-TOF 및 LC-MS를 이용한 서열 분석을 진행한 결과 면역활성 및 항전이 활성에 주로 공헌하는 arabino- β -3,6-galactan을 가진 rhamnagalacturonan I의 구조임이 확인함. |
| ⑱ 면역 및 항암 활성성분의 구조, 화학적 특성 규명 | ○ 브로콜리 식물체에서 높은 면역 및 항전이 활성을 보인 BCE-I은 1,3-galactan을 중심으로 1,6-galactan이 고도로 분지된 type II arabino- β -3,6-galactan의 구조를 밝히고 화학적 특성 규명함 |

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

| 성과 목표 | 사업화지표 | | | | | | | | | | 연구기반지표 | | | | | | | | | |
|-------------|--------|------|------|------------|-----|-----|-----|-----|------|------|--------|------|------|---------|------|------|------|----------|-------|----------------|
| | 지식 재산권 | | | 기술 실시 (이전) | | 사업화 | | | | | 기술인증 | 학술성과 | | | | 교육지도 | 인력양성 | 정책 활용·홍보 | | 기타 (타 연구 활용 등) |
| | 특허출원 | 특허등록 | 품종등록 | 건수 | 기술료 | 제품화 | 매출액 | 수출액 | 고용창출 | 투자유치 | | 논문 | | 논문평균 IF | 학술발표 | | | 정책 활용 | 홍보 전시 | |
| | | | | | | | | | | | | SCI | 비SCI | | | | | | | |
| 단위 | 건 | 건 | 건 | 건 | 백만원 | 건 | 백만원 | 백만원 | 명 | 백만원 | 건 | 건 | 건 | 건 | 명 | 건 | 건 | | | |
| 가중치 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 최종목표 | 1 | | | 1 | | 6 | | | | | 2 | 2 | 1.5 | 4 | | | | | | |
| 연구기간 내 달성실적 | 2 | 1 | | | | 6 | | | | | 2 | 2 | | 13 | | | | | | |
| 달성율(%) | | | | 1 | | 3 | | | | | | | | | | | | | | |

4. 핵심기술

| 구분 | 핵심 기술 명 |
|----|---|
| ① | 설포라관 함량이 증가된 브로콜리의 제조방법 및 그로부터 제조된 브로콜리의 이용 |
| ② | 면역 증강 활성 및 항암 활성이 있는 브로콜리 유래 다당 분획물 및 이의 제조방법 |
| ③ | 면역 증강 활성 및 항암 활성이 있는 적양배추 유래 다당체 및 이의 제조방법 |

5. 연구결과별 기술적 수준

| 구분 | 핵심기술 수준 | | | | | 기술의 활용유형(복수표기 가능) | | | | |
|-------|---------|-------|---------|------------|------------|-------------------|-------------|---------|-------|----|
| | 세계 최초 | 국내 최초 | 외국기술 복제 | 외국기술 소화·흡수 | 외국기술 개선·개량 | 특허 출원 | 산업체이전 (상품화) | 현장애로 해결 | 정책 자료 | 기타 |
| ①의 기술 | √ | | | | | √ | √ | | | |
| ②의 기술 | | √ | | | | √ | √ | | | |
| ③의 기술 | | √ | | | | √ | √ | | | |

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

| 핵심기술명 | 핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과 |
|-------|---|
| ①의 기술 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 건강기능식품 개발의 위한 연구 자료로 활용 ○ 개별인정형 건강기능식품 신청을 위한 기능성 근거 자료로 활용 ○ 제품 생산을 위한 기반 자료로 활용 |
| ②의 기술 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 건강기능식품 개발의 위한 연구 자료로 활용 ○ 개별인정형 건강기능식품 신청을 위한 기능성 근거 자료로 활용 ○ 제품 생산을 위한 기반 자료로 활용 |
| ③의 기술 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 건강기능식품 개발의 위한 연구 자료로 활용 ○ 개별인정형 건강기능식품 신청을 위한 기능성 근거 자료로 활용 ○ 제품 생산을 위한 기반 자료로 활용 |

7. 연구종료 후 성과창출 계획

| 성과목표 | 사업화지표 | | | | | | | | | | 연구기반지표 | | | | | | | | | |
|----------------|--------|------|------|-----------|-----|-----|--------|-------|------|------|--------|------|-----|---------|------|------|------|----------|------|----------------|
| | 지식 재산권 | | | 기술실시 (이전) | | 사업화 | | | | | 기술인증 | 학술성과 | | | | 교육지도 | 인력양성 | 정책 활용·홍보 | | 기타 (타 연구 활용 등) |
| | 특허출원 | 특허등록 | 품종등록 | 건수 | 기술료 | 제품화 | 매출액 | 수출액 | 고용창출 | 투자유치 | | 논문 | | 논문평균 IF | 학술발표 | | | 정책 활용 | 홍보전시 | |
| | | | | | | | | | | | SCI | 비SCI | | | | | | | | |
| 단위 | 건 | 건 | 건 | 건 | 백만원 | 건 | 백만원 | 백만원 | 명 | 백만원 | 건 | 건 | 건 | 건 | 명 | | | | | |
| 가중치 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 최종목표 | 1 | | | 1 | | 6 | | | | 1 | 2 | 2 | 1.5 | 4 | | | | 1 | | |
| 연구기간내 달성실적 | 2 | 1 | | | | 6 | | | | | 2 | 2 | | 13 | | | | | | |
| 연구종료 후 성과창출 계획 | | 2 | | 1 | | 3 | 약 10억원 | 약 8천불 | | 1 | | | | | | | | 1 | | |

